

N° d'Ordre :
477

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE D'INGÉNIEUR-DOCTEUR

PAR

Françoise LABEYRIE née PRUNIÈRES

1^{re} THÈSE. — ÉTUDE CINÉTIQUE DE LA PROTÉOLYSE TRYPSIQUE
DES FORMES NATIVES ET DÉNATURÉES DE LA
B-LACTOGLOBULINE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 29 Avril 1955 devant la Commission d'examen

MM. WURMSER . . .	Président
FROMAGEOT .	} Examineurs
CHAMPETIER .	

N° d'Ordre :
477

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE D'INGÉNIEUR-DOCTEUR

PAR

Françoise LABEYRIE née PRUNIÈRES

1^{re} THÈSE. — ÉTUDE CINÉTIQUE DE LA PROTÉOLYSE TRYPSIQUE
DES FORMES NATIVES ET DÉNATURÉES DE LA
B-LACTOGLOBULINE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 29 Avril 1955 devant la Commission d'examen

MM. WURMSER. . . *Président*

FROMAGEOT. }
CHAMPETIER. } *Examineurs*

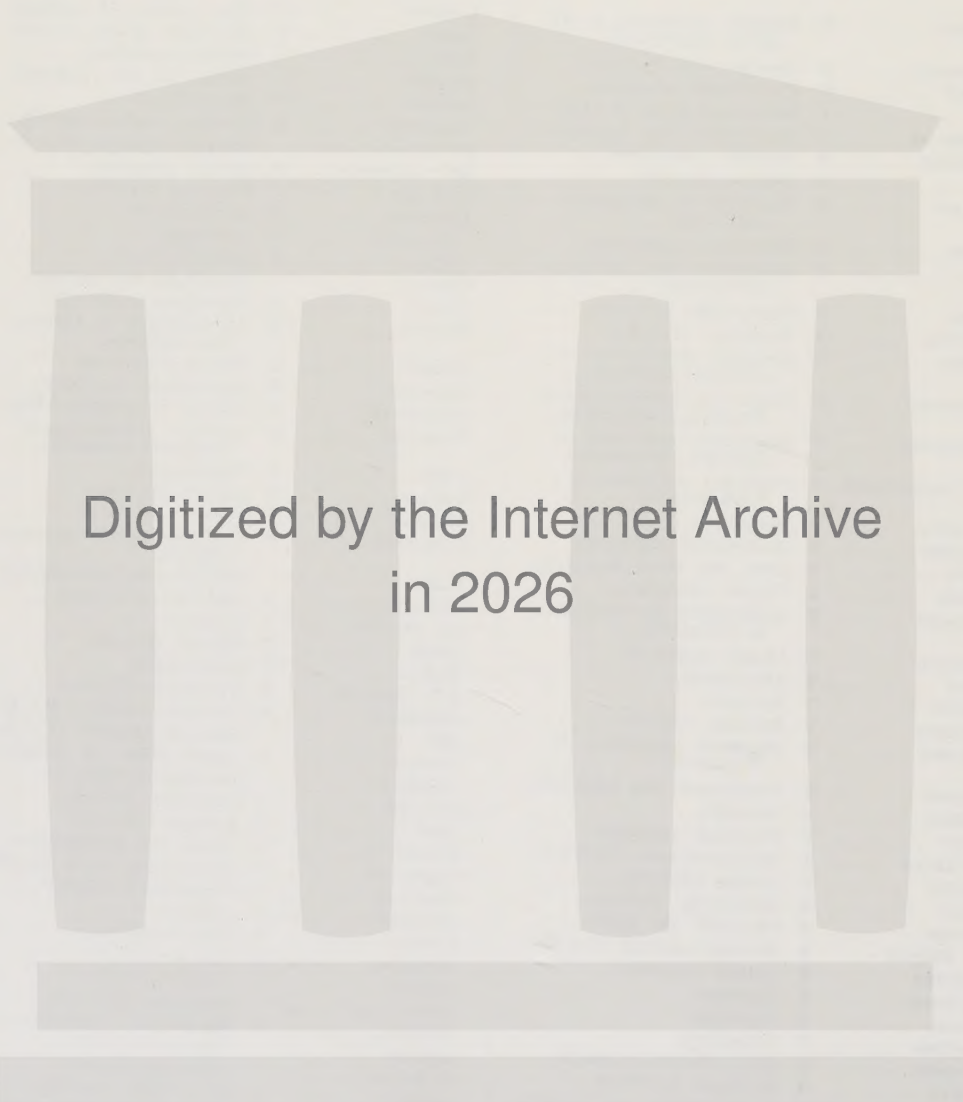
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen J. PÉRÈS

PROFESSEURS

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	LAPORTE	T	Phys. génér. et radioact.
E. DARMOIS	T	Enseign ^t de Physique.	JANET	T	Méc. anal. et Méc. céleste.
R. LÉVY	T	Physiologie comparée.	PETIT	T	Biologie maritime.
FOCH	T	Mécanique phys. et expér.	QUENEY	T	Météor. et dyn. atmosph.
PAUTHENIER	T	Electrotechnique générale.	GALLIEN	T	Embryologie.
DE BROGLIE	T	Théories physiques.	EICHHORN	T	Biologie végétale (P.C.B.)
JOB	T	Chimie générale.	DE CUGNAC	T	Biologie végétale (P.C.B.)
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées.	M ^{lle} CAUCHOIS ..	T	Chimie physique.
GARNIER	T	Géométrie supérieure.	THELLIER	T	Physique du globe.
PÉRÈS	T	Mécanique des fluides et applications.	AUDUBERT	T	Electrochimie.
LAUGIER	T	Physiologie générale.	L'HÉRITIER	T	Génétique.
M. CURIE	T	Physique (P.C.B.).	GRIVET	T	Radioélectricité.
BARRABE	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.	PONCIN	T	Mécanique des fluides.
G. DARMOIS	T	Calcul des probabilités et Physique mathématiq.	THIRY	T	Mécanique appliquée.
J. BOURCART	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres.
M ^{me} JOLIO-CURIE	T	Physique nucléaire et Radioactivité.	QUELET	T	Chimie organique.
PLANTEFOL	T	Botanique.	CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
CABANNES	T	Recherches physiques.	CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire.
GRASSE	T	Evol. des êtres organisés.	CUVILLIER	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.
PRÉVOST	T	Chimie organique.	JUNG	T	Pétrographie.
BOULIGAND	T	Application de l'analyse à la Géométrie.	TRILLAT	T	Chimie physique.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.	WIEMANN	T	Chimie (M.P.C.).
WYART	T	Minéralogie.	JACQUINOT	T	Spectroscopie et physique céleste.
TEISSIER	T	Zoologie.	VASSY		Physique de l'atmosphère.
MANGENOT	T	Biologie végétale.	DESTOUCHES	T	Théories physiques.
P. AUGER	T	Physique quantique et Relativité.	M. PRUVOST	T	Géologie
MONNIER	T	Physiologie des fonctions.	AMIEL	T	Chimie (P.C.B.).
PIVETEAU	T	Géologie.	HOCART	T	Minéralogie.
ROCARD	T	Physique (E.N.S.).	J.P. MATHIEU ..	T	Physique (P.C.B.).
H. CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.).	COUTEAUX	T	Biologie animale (P.C.B.)
LAFFITTE	T	Chimie générale.	MAY		Biologie animale (P.C.B.)
FAVARD	T	Mécanique générale.	CHOQUET	T	Calcul différ. et intégral.
COULOMB	T	Physique du globe.	FELDMANN		Biologie (P.C.B.).
M ^{lle} COUSIN	T	Biologie animale (P.C.B.).	GUINIER	T	Physique (P.C.B.).
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.	JOST	T	Biologie (P.C.B.).
P. DRACH	T	Zoologie.	FORTET	T	Calcul des probabilités.
KASTLER	T	Physique.	SCHWARTZ	T	Méth. math. de la physiq.
EPHERUSSI	T	Génétique.	CHOUARD	T	Physiologie végétale.
WURMSER	T	Biol. physico-chimique.	MALAVARD	T	Aviation.
RIVIÈRE	T	Géologie (S.P.C.N.)	BRELOT	T	Calcul différentiel.
GAUTHERET	T	Biologie végétale (P.C.B.).	NORMANT	T	Chimie (P.C.B.)
LUCAS	T	Physique.	BENARD		Chimie (P.C.B.)
A. THOMAS	T	Biologie cellulaire.	BUVAT		Botanique (E.N.S.).
ARNULF	T	Optique appliquée.	DUGUÉ	T	Statistiques mathématiq.
M. MORAND	T	Physique.	GELOSO		Chimie (S.P.C.N.).
SOLEILLET	T	Physique.	SOULAIRAC		Psychophysiologie.
FORTIER	T	Mécan. expér. des fluides.	ULRICH	T	Physiologie végétale.
DANJON	T	Astronomie.	MARÉCHAL	T	Optique théorique et appl.
FROMAGEOT	T	Chimie biologique.	KIRRMANN	T	Théories Chimiques
			CHADEFAUD		Botanique.
			DESTRIAU		Physique (M.P.C.).
			M ^{lle} LE BRETON ..		Physiologie générale.
			SALEM		Mathématiques générales.
			ESCLANGON	T	Physique (P.C.B.).
			LELONG	T	Mathématiques générales.

Secrétaire général CH. MONIER



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552212_0049

A la mémoire de Louis RAPKINE

A Monsieur René WURMSER

A tous les miens

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Biologie Physico-Chimique de la Faculté des Sciences (Institut de Biologie Physico-Chimique), sous la direction de Monsieur le Professeur René Wurmser. Je voudrais ici le remercier de m'avoir accueilli dans son laboratoire après la mort de Louis Rapkine. Je tiens à lui témoigner mon affection et toute ma gratitude pour sa bienveillance, pour l'enseignement et les précieux conseils dont il m'a fait constamment bénéficier.

Je remercie Monsieur le Professeur Fromageot qui a bien voulu accepter de faire partie de mon jury pour l'intérêt qu'il a porté à ces recherches et pour les judicieuses critiques qu'il m'a faites.

Monsieur le Professeur Champetier, dont j'ai été l'élève à l'Ecole de Physique et Chimie m'a conseillé avec une grande bienveillance et a bien voulu accepter de faire partie de mon jury, je tiens à l'en remercier.

Je suis reconnaissante à Monsieur Jacques Tonnelat, Maître de Recherches au C.N.R.S. et régisseur du laboratoire, pour m'avoir aidé à réunir les appareils et le matériel dont j'ai eu besoin, et pour ses judicieux conseils.

Que tous mes collègues du laboratoire soient assurés de ma vive gratitude pour l'amitié qu'ils m'ont toujours témoignée; je pense tout particulièrement à Mademoiselle Jeannine Yon qui, travaillant sur un sujet voisin avec des méthodes analogues, m'a aidée avec une grande gentillesse et efficacité pour quelques expériences délicates; j'ai eu avec elle de constants échanges de vues ainsi qu'avec Madame Hélène Guastalla et Mademoiselle Sylvanie Guinand qui m'ont ainsi aidé dans ce travail par d'utiles suggestions.

Je remercie Monsieur et Madame de Mende, du Centre

d'électrophorèse du C.N.R.S., d'avoir effectué pour moi les électrophorèses et d'avoir participé activement aux expériences concernant l'étude des hydrolysats par électrophorèse sur papier, ainsi que Monsieur Navier pour avoir effectué les ultracentrifugations.

Je n'oublie pas la collaboration efficace de Messieurs Lamy, Bâton et Le Gal qui m'ont aidé à construire et à mettre au point l'appareillage nécessaire.

Je tiens encore à exprimer ma reconnaissance à Messieurs Février et Mocquot, du laboratoire de la Recherche Agronomique de Jouy-en-Josas, pour m'avoir procuré des facilités pour les préparations de β -lactoglobuline.

* * *

Table des matières

INTRODUCTION	page 1
 I - PARTIE THEORIQUE	
1. <u>Mécanisme des réactions enzymatiques.</u>	
1.1 Exposé général dans le cas des faibles concentrations d'enzyme.	
1.11 Théorie de Victor Henri	5
1.12 Théorie de Briggs et Haldane	6
1.13 Détermination expérimentale de la constante de Michaelis.. .. .	7
1.2 Variation des constantes de Michaelis et des constantes de vitesse k_2 avec la température.. ..	7
1.21 Enthalpie de formation du complexe enzyme-substrat	8
1.221 Interprétation des valeurs expérimentales	8
1.222 Variation d'énergie libre, d'entropie et d'enthalpie correspondant à l'activation du complexe enzyme-substrat	9
1.3 Généralisation: cas où les concentrations d'enzyme sont grandes par rapport à la concentration en substrat.	
1.31 Formulation	10
1.32 Discussion	10
2. <u>Mécanisme des réactions de dégradation protéolytique.</u>	
2.1 Conceptions actuelles: produits intermédiaires	13
2.2 Signification des constantes de Michaelis expérimentales dans quelques cas particuliers	14
2.21 Dénaturation réversible du substrat protéique.. .. .	16
2.22 Dénaturation par l'enzyme protéolytique.. ..	18
 II - METHODES - PREPARATIONS	
1. <u>Méthodes de mesure des vitesses de protéolyse.. ..</u>	21
1.2 Titrage des groupes carboxyles apparus en milieu acétonique	23

1.21	Principe	page	23
1.22	Technique expérimentale	"	24
1.23	Critique	"	25
1.3	Titration continue des groupes α -ammonium apparus	"	26
1.31	Principe	"	26
1.32	Pourcentage des groupes titrés.. ..	"	26
1.33	Application à la mesure de protéolyse des protéines	"	27
1.34	Technique.. .. .	"	27
1.35	Critique. Précision	"	30
1.4	Comparaison expérimentale de la méthode de titration en milieu acétonique avec la méthode continue	"	30
1.5	Méthode trichloracétique.	"	32
1.51	Principe	"	32
1.52	Variation des vitesses d'apparition des produits solubles avec les concentra- tions en lactoglobuline	"	33
	- Techniques	"	33
	- Résultats.. .. .	"	34
1.53	Variation de la fraction en solution avec la concentration du précipité ..	"	36
1.6	Comparaison de la méthode trichloracétique avec la méthode de titration continue des liaisons peptidiques détruites.. .. .	"	39
1.7	Etude de l'hydrolyse par électrophorèse sur papier et ultracentrifugation analytique ..	"	41
1.71	Electrophorèse sur papier	"	42
	1.711 Techniques	"	42
	1.712 Résultats:		
	- Coloration	"	44
	- Observation qualitative des diagrammes	"	45
	- Analyse quantitative des diagrammes	"	45
1.72	Ultracentrifugation analytique.. ..	"	48
1.8	Conclusions	"	50
2.	<u>Préparations.</u>		
2.1	Trypsine	"	51
2.2	β -Lactoglobuline native.		
2.21	Préparation	"	52
2.22	Electrophorèse	"	52
2.23	Electrophorèse sur papier	"	54

2.3	β -Lactoglobuline dénaturée par la chaleur ..	page	54
2.31	Préparation du composant lent "s".. ..	"	56
2.32	Préparation du composant rapide "f".. ..	"	58

IIIe PARTIE ETUDE EXPERIMENTALE DE LA PROTEOLYSE DE LA LACTOGLOBULINE NATIVE ET DENATUREE PAR LA CHALEUR

1.	<u>Lactoglobuline native.</u>		59
1.1	Remarque sur la mesure du pH des solutions ..	"	59
1.2	Stabilité des solutions	"	59
1.3	Influence de la force ionique	"	60
1.4	Variation des vitesses de protéolyse avec la concentration en trypsine	"	60
1.5	Variation des vitesses avec la température: énergie d'activation	"	64
1.6	Variation des vitesses avec les concentrations en substrat	"	66
1.61	Variation des constantes de Michaelis avec la température.		
1.611	Résultats expérimentaux.. ..	"	68
1.612	Equivalence de Km avec la con- stante de dissociation du complexe trypsine-lactoglobuline	"	71
1.613	Energétique de la formation du complexe trypsine-lactoglobuline	"	71
1.62	Influence du borate sur la vitesse maxima et la constante de Michaelis ..	"	72
2.	<u>Lactoglobuline dénaturée par la chaleur:</u> <u>Formes "s" et "f".. .. .</u>	"	76
2.1	Variation de la vitesse avec la température: énergie d'activation	"	76
2.2	Variation des vitesses avec les concen- trations en substrat: constantes de Michaelis	"	76
3.	<u>Comparaison des protéolyses des formes native et dénaturées. Discussion.</u>		
3.1	Constantes de Michaelis	"	80
3.11	Liaisons peptidiques accessibles	"	80
3.12	Homogénéité des solutions protéiques	"	82
3.13	Comparaison des affinités de la try- psine pour les formes native et dénaturées	"	82
3.14	Comparaison avec les données biblio- graphiques	"	83
3.15	Variations avec la température.. ..	"	84

3.2	Constantes de vitesse de décomposition du complexe enzyme-substrat.. ..	page	84
3.21	Energies d'activation.. ..	"	85
3.22	Variation d'énergie libre, d'entropie et d'enthalpie	"	86
3.3	Discussion des résultats en rapport avec l'hypothèse de la dénaturation préalable ..	"	89
3.31	Dénaturation réversible	"	91
3.32	Dénaturation catalysée par la trypsine	"	93
3.33	Conclusions	"	93
SOMMAIRE		"	95
BIBLIOGRAPHIE		"	97

* *

DEUXIEME THESE.

* * *

INTRODUCTION

On a généralement constaté que la vitesse d'hydrolyse des protéines dénaturées par les enzymes protéolytiques est plus grande que celle des protéines natives. La théorie des réactions enzymatiques indique que ces différences peuvent être imputées soit à une différence d'affinité de l'enzyme pour les formes natives et dénaturées, soit à une différence dans la vitesse de décomposition du complexe intermédiaire enzyme-substrat, soit à l'addition de ces deux effets.

Une étude des constantes de Michaelis et des constantes de décomposition du complexe intermédiaire correspondant à la protéolyse des formes natives et dénaturées d'une même protéine, doit permettre de conclure auquel des mécanismes précédents se rattachent les différences observées. Ces déterminations apporteront davantage d'informations si elles sont faites à plusieurs températures. On peut en effet en déduire alors les grandeurs énergétiques qui concernent les deux processus de formation réversible et de décomposition du complexe intermédiaire.

Il faut pour cela admettre que la protéolyse est une réaction simple qui suit la loi des réactions enzymatiques telle qu'elle est exprimée par la relation d'Henri $-\frac{ds}{dt} = k_2 \frac{e s}{(K_m + s)}$.

(e et s : concentrations de l'enzyme et du substrat,
 k_2 et K_m : constantes de vitesse et de Michaelis).

Si, comme l'a supposé Linderström-Lang, la protéolyse de la protéine native se fait avec un processus initial de dénaturation, il est possible en appliquant à ce schéma la loi d'action de masse d'en déduire les relations qui lient la constante de Michaelis expérimentale de la forme native à celle de la forme dénaturée. On peut donc chercher à voir si les résultats des expériences sont cohérents avec une telle hypothèse.

Nous avons donc étudié les protéolyses par la trypsine de la lactoglobuline native, et de deux formes de lactoglobuline dénaturée par la chaleur, dont les techniques de préparation ont été décrites par Briggs et Hull; on peut obtenir chacune d'elles à l'état électrophorétiquement homogène. L'une est dénaturée pendant une dizaine de minutes à 100°: c'est la forme "s"; l'autre qui subit le même traitement est ensuite recuite 4 heures à 60°; c'est la forme "f".

A partir des variations de vitesse avec la concentration en substrat, nous avons déterminé les constantes de Michaelis et les vitesses maxima et ceci à plusieurs températures comprises entre 20° et 45°. Nous avons déterminé les énergies d'activation en mesurant les vitesses de réaction à plusieurs températures.

Pour la lactoglobuline native, nous avons étudié également l'influence sur la vitesse de réaction de certains facteurs comme la concentration en enzyme, le milieu salin (chlorure de sodium ou tampon borate), et le temps d'attente à pH 8.

La principale difficulté liée aux déterminations de constante de Michaelis ou d'énergie d'activation est le manque de méthode précise pour mesurer la vitesse d'attaque du substrat protéique. Pour la résoudre, nous avons choisi la méthode de titrage des liaisons peptidiques détruites, et nous avons discuté les conditions dans lesquelles la vitesse ainsi mesurée est proportionnelle à la vitesse d'attaque de la protéine. Nous avons été ainsi amenée:

- à faire une étude analytique par ultracentrifugation et électrophorèse sur papier des hydrolysats correspondant à des degrés variables de protéolyse, pour y chercher s'il y a éventuellement formation de produits intermédiaires;

- à comparer quantitativement pendant toute la durée d'une protéolyse la méthode de titrage des liaisons peptidiques détruites avec la variation de concentration de la lactoglobuline native. Celle-ci est identifiable par sa mobilité sur les bandes d'électrophorèse sur papier; sa concentration est mesurée par photométrie après coloration au bleu de bromophénol.

Cette comparaison entre une méthode précise mais en principe peu sûre, et une méthode imprécise mais théoriquement juste, nous permettra de savoir s'il est correct d'utiliser la première, et, dans ce cas, de déterminer le nombre de liaisons peptidiques détruites par molécule de lactoglobuline hydrolysée.

* * *

I - PARTIE THEORIQUE

1. MECANISME DES REACTIONS ENZYMATIQUES.1.1 Exposé général dans le cas des faibles concentrations d'enzyme.1.11 Théorie de Victor Henri.

En formulant, dès 1903, une théorie générale des réactions enzymatiques, Henri [30] a apporté une contribution essentielle à la biochimie quantitative. Il a montré que parmi les mécanismes concevables pour expliquer l'action catalytique d'un enzyme, le seul en accord avec les résultats expérimentaux est celui-ci: l'enzyme E et le substrat S s'unissent d'abord réversiblement pour donner un complexe intermédiaire selon le schéma



puis ce complexe se décompose irréversiblement en libérant l'enzyme et les produits de la réaction



k_1 , k_1' et k_2 sont les constantes de vitesse respectives de formation, dissociation et décomposition du complexe intermédiaire.

Henri a appliqué la loi d'action de masse à chacune de ces réactions et obtient les relations:

$$\frac{(S)(E)}{(SE)} = K = \frac{k_1'}{k_1} \quad (3)$$

et
$$v = -\frac{d(S)}{dt} = k_2 \cdot (SE) \quad (4)$$

(E), (S), (SE) sont les concentrations respectives de l'enzyme libre, du substrat libre et du complexe. Elles sont liées aux concentrations totales e et s, en enzyme et substrat par les deux relations:

$$\left. \begin{aligned} (E) + (SE) &= e \\ (S) + (SE) &= s \\ (SE) &= p \end{aligned} \right\} \quad (5)$$

notons:

Victor Henri a supposé que (S) est grand par rapport à (E) et par conséquent à (ES), alors $s = (S)$.

On peut donc écrire la relation:

$$p.K = (e - p) s \quad (6)$$

$$\text{d'où} \quad v = \frac{k_2 e s}{K + s} \quad (7)$$

1.12. Théorie de Briggs et Haldane.

Admettre que les concentrations en enzyme, substrat et complexe intermédiaire sont liées par la relation (3), c'est admettre que la vitesse avec laquelle s'établit l'équilibre est grande par rapport à la vitesse de décomposition du complexe. Briggs et Haldane [8] ont montré que lorsque cette condition n'est pas réalisée, on obtient la vraie valeur du rapport $(E)(S)/(SE)$, en écrivant les conditions pour lesquelles la concentration du complexe est constante dans l'intervalle de temps considéré, soit $\frac{dp}{dt} = 0$

$$\text{ou} \quad (k_1' + k_2)(SE) - k_1(E)(S) = 0$$

$$\text{c'est-à-dire} \quad \frac{(E)(S)}{(SE)} = \frac{k_1' + k_2}{k_1}$$

Notons K_m , cette nouvelle constante, en maintenant la condition $s = (S)$, on obtient la relation:

$$p K_m = (e - p) s \quad (8)$$

de forme identique à la relation (6).

La vitesse de réaction s'exprime donc par la même relation que celle d'Henri (relation 7), la constante n'est plus la constante de dissociation $K = k_1'/k_1$, mais $K_m = (k_1' + k_2)/k_1$ qu'on appelle constante de Michaelis.

1.13 Détermination expérimentale de la constante de Michaelis.

Michaelis et Menten [46], en 1913, ont été les premiers à se préoccuper de la détermination expérimentale de cette constante K_m .

Parmi les procédés proposés depuis pour exprimer graphiquement les variations de vitesse avec les concentrations du substrat de manière à déterminer K_m , l'une des plus pratiques est celle proposée par Eadie [21] qui met la relation (7) sous la forme:

$$v = V - \frac{V}{S} \cdot K_m \quad (9)$$

v est une fonction linéaire de v/s , la pente de la droite est K_m ; son ordonnée à l'origine: $V = k_2 \cdot e$ est la vitesse maxima: c'est la vitesse atteinte lorsque la concentration en substrat est grande par rapport à la constante de Michaelis ($K_m/s \sim 0$).

1.2 Variation des constantes de Michaelis et des constantes de vitesse k_2 avec la température.

D'une manière générale les variations avec la température des constantes d'équilibre K des réactions réversibles d'une part, et des constantes de vitesse de réaction k d'autre part, permettent de déterminer respectivement la variation d'enthalpie ΔH et l'énergie d'activation μ correspondant à ces réactions.

Pratiquement, $\Delta H/2,3 R$ et $\mu/2,3 R$ sont donnés par les pentes des droites obtenues en portant en abscisses $1/T$ et en ordonnées le logarithme décimal de K ou k respectivement ($R = 2,0$ calories par degré). Puisqu'une réaction enzymatique met en jeu deux processus distincts (cf. § 1.11) "l'énergie d'activation" expérimentale déterminée par l'étude des variations de vitesse de réaction avec la température, est

une fonction complexe des énergies d'activation correspondant à chacune des constantes de vitesse k_1 , k_1' et k_2 .

Il est possible, dans certaines conditions, de connaître séparément la variation d'enthalpie correspondant à la formation réversible du complexe et l'énergie d'activation de la réaction de décomposition de ce complexe.

1.21 Enthalpie de formation du complexe enzyme-substrat.

On a vu que la constante de Michaelis se confond avec la constante d'équilibre k_1'/k_1 dans le cas particulier où k_2 est très petit devant k_1 . Quand cette condition est remplie, la variation avec la température de la constante de Michaelis permet de calculer la variation d'enthalpie de formation du complexe intermédiaire. Sinon, comme il a été maintes fois souligné, les variations de K_m avec la température ne sont pas interprétables.

1.22 Energie d'activation de décomposition du complexe enzyme-substrat.

Lorsque K_m ne varie pas avec la température, on peut obtenir directement l'énergie d'activation μ par l'étude des variations de vitesse de réaction avec la température.

Dans le cas général où K_m varie avec T , on détermine μ soit en travaillant avec une concentration en substrat grande devant K_m si cela est possible, soit par l'étude de K_m et v à chaque température.

1.221 Interprétation des valeurs expérimentales.

Il est évident que pour avoir une valeur de μ qui corresponde vraiment à une réaction déterminée, par exemple à la décomposition du complexe intermédiaire, tous les autres facteurs susceptibles de modifier la vitesse doivent être identiques à chaque température. S'il existe des réactions d'équilibre entre formes actives et inactives ou même plus ou moins actives soit de l'enzyme, soit du substrat, et si ces équilibres sont fonctions de la température, les résultats trouvés ne seront généralement pas interprétables; citons par exemple des variations du pH,

de l'état d'ionisation du substrat ou de l'enzyme, des concentrations d'inhibiteur ou d'activateur liées à des réactions d'équilibre à chaleur de réaction non nulle.

1.222 Variation d'énergie libre, d'entropie et d'enthalpie correspondant à l'activation du complexe enzyme-substrat.

La théorie des vitesses absolues, dont l'idée est due à Marcelin et qui a été développée principalement par Eyring permet de calculer la variation d'énergie libre d'activation ΔF^* entre la forme stable du complexe enzyme-substrat et sa forme activée $(ES)^*$. On sait, d'après les faibles valeurs de ΔF^* pour les réactions enzymatiques, que cette activation correspond généralement à l'étirement ou à l'affaiblissement d'une seule liaison; les positions des deux atomes intéressés devenant instables, le système évolue jusqu'à rupture complète de la liaison en question.

L'énergie libre d'activation du complexe intermédiaire est donnée par la relation:

$$\Delta F^* = -RT \ln \frac{k_2^0}{RT/Nh}$$

R: constante des gaz; T: température absolue; N: nombre d'Avogadro; h: constante de Planck; k_2^0 : vitesse de réaction exprimée en molécule-gramme par litre de substrat, par seconde, par molécule-gramme par litre d'enzyme.

A 35°C: $RT/Nh = 6,46 \cdot 10^{12}$

Par définition, la variation d'énergie libre ΔF^* est liée aux variations d'entropie ΔS^* et d'enthalpie ΔH^* par la relation:

$$\Delta F^* = \Delta H^* - T \Delta S^*$$

On sait d'autre part que $\Delta H^* = \mu - RT$.

On calcule ainsi les valeurs de ΔH^* , ΔF^* et ΔS^* à partir de μ et de k_2 .

1.3 Généralisation: cas où les concentrations d'enzyme sont grandes par rapport à la concentration en substrat.

1.31 Formulation.

La proportionnalité des vitesses aux concentrations d'enzyme est liée à l'hypothèse que dans l'expression (4) s peut être confondu avec (S) , or cette condition n'est pas toujours réalisée, Straus et Goldstein [62] ont établi les formules générales liant la vitesse de réaction aux concentrations d'enzyme et de substrat lorsqu'on ne fait pas cette hypothèse restrictive. Ces formules sont du deuxième degré en v , nous allons les établir et les discuter rapidement sous une forme un peu différente.

Si l'on ne suppose pas que $s = (S)$, la relation (8) devient

$$p \cdot K_m = (e-p) \cdot (s-p) \quad (10)$$

que l'on peut mettre sous la forme:

$$1 - \frac{p}{e} - \frac{p}{s} (1 - \frac{p}{e}) = \frac{p}{s} \cdot \frac{K_m}{e}$$

ou

$$\frac{p}{s} \left[\frac{K_m}{e} + (1 - \frac{p}{e}) \right] = (1 - \frac{p}{e})$$

comme $v = k_2 \cdot p$ et $V = k_2 \cdot e$, on peut écrire cette relation sous une forme équivalente à (9), soit:

$$\frac{v}{e} = \frac{V}{e} - \frac{v}{s} \left[\frac{V-v}{V} + \frac{K_m}{e} \right] \quad (11)$$

1.32 Discussion.

Cette relation est facile à discuter selon les grandeurs relatives des deux termes entre parenthèses.

a) Si $\frac{V-v}{V}$ est très petit par rapport à $\frac{K_m}{e}$ la relation devient:

$$v = V - \frac{V}{s} \cdot K_m$$

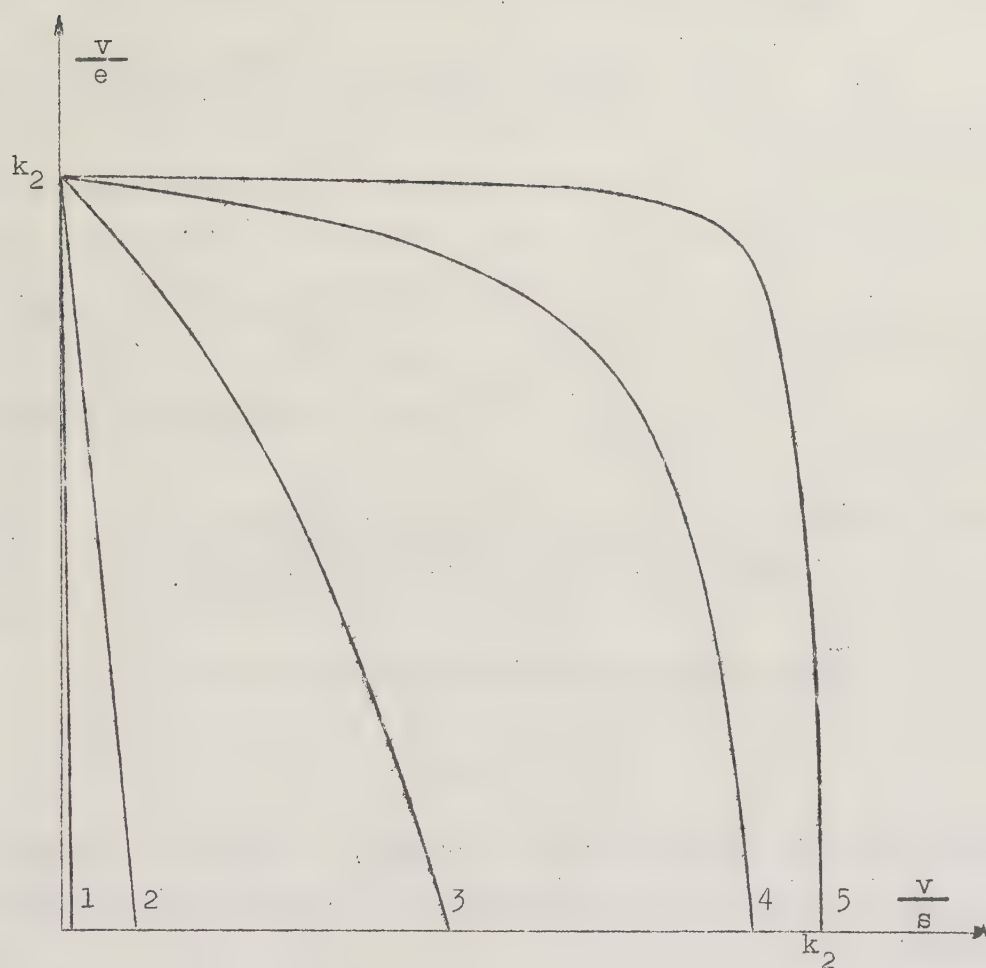


Figure 1.

Variations de v/e en fonction de v/s , pour différentes valeurs du rapport e/Km .

- courbe 1 : $e/Km = 1/100$
- courbe 2 : $e/Km = 1/10$
- courbe 3 : $e/Km = 1$
- courbe 4 : $e/Km = 10$
- courbe 5 : $e/Km = 100$

v est alors une fonction linéaire de v/s . Les vitesses sont proportionnelles aux concentrations d'enzyme.

La pente de la droite est K_m : constante de Michaelis.

La condition $(V-v)/V \ll K_m/e$ peut s'écrire en tenant compte de la relation précédente

$$\frac{K_m}{K_m + s} \ll \frac{K_m}{e} \quad \text{ou} \quad e \ll K_m + s.$$

Si e est petit par rapport à K_m , cette condition est réalisée quel que soit s . Si e n'est pas petit par rapport à K_m , la linéarité de la relation $v = f(v/s)$ n'est effective que pour les valeurs de s grandes par rapport à e .

b) Si $\frac{V-v}{V}$ est très grand par rapport à K_m/e , on aura: $v = s \cdot \frac{V}{e}$: la vitesse est indépendante des concentrations d'enzyme.

$$\frac{V-v}{V} \gg \frac{K_m}{e} \quad \text{peut s'écrire} \quad \frac{e-s}{e} \gg \frac{K_m}{e}$$

$$\text{ou} \quad e \gg K_m + s$$

En augmentant les concentrations en substrat, il arrive un moment où cette condition n'est plus valable et on se trouve ramené au cas envisagé ci-dessous.

c) Considérons les valeurs intermédiaires de e par rapport à $K_m + s$, les deux termes de la parenthèse interviennent effectivement, la relation est du deuxième degré en v , la représentation graphique $v = f(v/s)$ ne donnera pas une droite. Les pentes des tangentes à ces courbes ou constantes de Michaelis expérimentales varieront donc d'une part avec les concentrations du substrat, d'autre part avec les concentrations d'enzyme.

La figure 1 (page 11) donne l'exemple de quelques courbes ainsi calculées pour différents rapports e/K_m . Pour déterminer les constantes de Michaelis lorsque la relation n'est pas linéaire, la vraie valeur de K_m est la pente de la courbe lorsque s tend vers de grandes valeurs.

2. MECANISME DES REACTIONS DE DEGRADATION PROTEOLYTIQUE.

2.1 Conceptions actuelles: produits intermediaires.

Nous avons vu dans les paragraphes précédents les lois générales des réactions enzymatiques. La dégradation des protéines par coupure des liaisons peptidiques sous l'influence des enzymes protéolytiques obéit à ces lois. Toutefois l'interprétation des résultats expérimentaux est souvent difficile en raison de la complexité de ces réactions de protéolyse.

En ce qui concerne le processus de dégradation, Tiselius et Eriksson-Quensel [34] ont été les premiers à poser l'alternative suivante:

- a) ou bien toutes les molécules de protéine sont attaquées simultanément mais graduellement jusqu'aux produits qui ne sont plus attaquables par l'enzyme,
- b) ou bien peu de molécules sont attaquées dans chaque intervalle de temps, mais chacune est coupée très rapidement jusqu'aux produits finaux de la dégradation.

Nous exprimerons cette alternative sous une forme un peu différente:

- a) Chaque fois que se forme un complexe trypsine-protéine ou trypsine-polypeptide, une seule liaison peptidique est rompue. Si N liaisons peptidiques sont susceptibles d'être finalement coupées, la protéolyse globale résulte d'une série de N réactions successives.
- b) Plusieurs liaisons peptidiques, ou même toutes, peuvent être coupées simultanément provoquant une "explosion" de la molécule protéique.

Dans le premier cas, la réaction de dégradation se fera par une suite d'étapes successives mettant en jeu une série de composés intermédiaires plus ou moins dégradés.

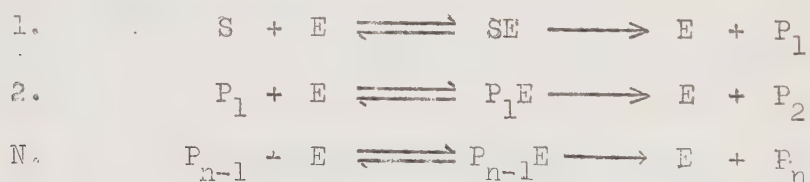
Dans le deuxième cas, il n'existera que deux espèces de produits: la protéine intacte et les produits ultimes de dégradation.

Or, toute une série d'expériences [1,64,44,29,55,6,7,67,4,48,19,20] amorcée par Svedberg et Eriksson en 1934 [63], et dont Christensen [16] a donné récemment une revue détaillée, montrent, par analyse d'hydrolysats par diverses méthodes (électrophorèse, ultracentrifugation, etc.) que,

souvent, on ne trouve effectivement pas de produits intermédiaires. Linderström-Lang [40] a démontré que ces expériences ne constituent pas une preuve que la réaction obéit au mécanisme 2, puisqu'on peut obtenir exactement le même aspect lorsque la vitesse de dégradation des produits intermédiaires est grande par rapport à la vitesse de coupure de la protéine. Petermann [55] a trouvé en effet qu'en faisant varier les conditions expérimentales et en se plaçant à des pH plus ou moins éloignés du pH optimum de la réaction, on peut constater la présence ou l'absence de produits intermédiaires.

Il semble donc que l'hypothèse de l'explosion soit fort peu probable. Des informations à ce sujet peuvent être obtenues par l'étude des chaleurs de réaction et des variations d'entropie correspondant à l'activation du complexe intermédiaire. L'ordre de grandeur de ces chaleurs de réaction doit permettre d'apprécier si une seule, ou si au contraire un grand nombre de liaisons peptidiques sont mises en jeu dans le processus d'activation.

On peut donc considérer la réaction de protéolyse comme une suite de réactions successives du type:



Chacune de ces réactions est caractérisée par sa constante de vitesse α_i et sa constante de Michaelis Km_i .

2.2 Signification des constantes de Michaelis expérimentales dans quelques cas particuliers.

Si nous voulons étudier la réaction de protéolyse comme une réaction enzymatique simple, pour en déduire les constantes de Michaelis par exemple, ou des données énergétiques, les résultats n'auront un sens que si les vitesses initiales déterminées sont bien les vitesses initiales d'attaque du substrat protéique. Réciproquement, si on dispose de telles méthodes, le fait que la réaction globale est une réaction complexe ne

change pas la signification des résultats.

Nous allons discuter la validité des méthodes globales qui donnent la mesure du nombre total de liaisons peptidiques détruites par unité de temps.

Si, dans un système de réactions analogue au schéma ci-dessus, on est un moment donné dans un état stationnaire, on a la relation suivante:

$$-\frac{dS}{dt} = \left(\frac{dP_1}{dt}\right)_1 = \left(\frac{dP_2}{dt}\right)_2 = \dots = \left(\frac{dP_n}{dt}\right)_n$$

qui indique que la vitesse de formation $\left(\frac{dP_i}{dt}\right)_i$ de chaque composé intermédiaire est égale à sa vitesse de destruction; à ce moment s'il y a N réactions successives, et si une liaison peptidique est coupée dans chacune d'elles, si v est la vitesse mesurée par titrage des liaisons peptidiques rompues,

$$v = \frac{dP_1}{dt} + \frac{dP_2}{dt} + \frac{dP_i}{dt} + \dots = N \cdot \frac{dS}{dt}$$

elle est donc proportionnelle à la vitesse d'attaque de la protéine.

La mesure des vitesses de réaction par titrage des liaisons peptidiques détruites est donc correcte quand les concentrations des produits P_1, P_2, P_i sont constantes dans l'intervalle de temps considéré. On est donc amené à discuter les conditions dans lesquelles cet état stationnaire s'établira rapidement en début de la réaction. La vitesse d'établissement de l'état de régime est fonction des valeurs relatives des différentes constantes de vitesse.

A. Si le premier processus est le plus lent et s'il est suivi par des processus rapides, l'état de régime sera atteint d'autant plus rapidement que l'écart sera grand entre les vitesses respectives de ces processus.

B. Si le deuxième processus est le plus lent et s'il est suivi par des processus rapides, P_1 se forme beaucoup plus rapidement qu'il ne se dégrade, il va donc s'accumuler; cette phase de la réaction durera jusqu'au moment où la vitesse de sa destruction sera égale à la vitesse de sa formation:

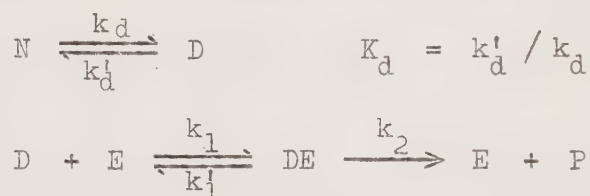
- soit à cause de l'augmentation de (P_1) ,

- soit par diminution de (S).

Pendant toute la période où s'accumule le produit P_1 , l'état n'est pas stationnaire et les vitesses mesurées par titrage des liaisons peptidiques détruites n'auront pas de signification.

2.21 Dénaturation réversible du substrat protéique.

Linderström-Lang, Hotchkiss et Johansen [41] ont pensé que la différence de sensibilité apparente entre les protéines natives et dénaturées pouvait s'expliquer de la façon suivante: la forme native n'est pas hydrolysable, mais elle est en équilibre avec une forme dénaturée dans laquelle les liaisons peptidiques sont accessibles et qui peut être dégradée par les enzymes protéolytiques. Le schéma de la réaction serait donc:



En appliquant la loi d'action de masse au système précédent et en supposant que l'état est stationnaire, c'est-à-dire que les concentrations en D et DE sont constantes dans l'intervalle de temps considéré, situé au voisinage du point zéro de la réaction, on peut écrire les relations:

$$\begin{aligned} [E] + p &= e \\ [N] + [D] + p + [P] &= s \\ (N)k_d + p k_1' &= (D)k_d' + (E)(D)k_1 \\ p K_{m_D} &= (E)(D) \qquad \text{avec } K_{m_D} = \frac{k_2 + k_1'}{k_1} \end{aligned}$$

En éliminant les variables (D), (E) et (N), nous obtenons une relation que l'on peut mettre sous une forme analogue à celle de la relation (10). Aucune hypothèse restrictive n'a été faite sur les valeurs relatives de e, s et p. On suppose seulement qu'on est en début de réaction, c'est-à-dire que (P) = 0:

$$\frac{p \cdot K_m_D (K_d + 1)}{1 + k_2 / k_d} = (e - p) \left(\frac{s}{1 + k_2 / k_d} - p \right) \quad (12)$$

d'après la discussion faite au paragr. 1.32, la vitesse de réaction v sera une fonction linéaire de v/s , lorsque:

$$e \ll [s + K_m_D (K_d + 1)] / (1 + k_2 / k_d) \quad (13)$$

Quand cette condition (13) est réalisée, la relation (12) se simplifie en:

$$p \cdot K_m_D (K_d + 1) = (e - p)s$$

La constante apparente de Michaelis est donc $K_m_N = K_m (K_d + 1)$, K_d étant, rappelons le, la constante d'équilibre N/D .

Il faut insister sur le fait que l'aspect des courbes représentatives dépend, non pas des valeurs relatives de e par rapport à $K_m_N + s = K_m_D (K_d + 1) + s$, faisant intervenir la constante de Michaelis apparente, mais les valeurs de e par rapport à $[K_m_D (K_d + 1) + s] / (1 + k_2 / k_d)$.

Cette expression peut être beaucoup plus petite que K_m_N et d'autant plus que la vitesse de dénaturation k_d est faible par rapport à la vitesse de protéolyse du substrat D , soit k_2 .

a) lorsque la vitesse limitante est la vitesse de dénaturation $k_d \ll k_2$, les concentrations d'enzyme pour lesquelles la condition (13) est réalisée, seront très faibles. Lorsque e est grand par rapport au deuxième terme de la relation (13), on aura:

$$v = k_d \cdot s$$

b) lorsque la vitesse limitante est la vitesse de décomposition du complexe intermédiaire, $k_d \gg k_2$, la condition (13) s'exprime

$e \ll K_{m_D}(K_d+1) + s$, et la constante apparente de Michaelis est

$$K_{m_N} = K_{m_D}(K_d+1).$$

On devra s'attendre à ce que K_{m_N} ait alors un coefficient de température analogue à celui d'un équilibre de dénaturation. L'étude des variations avec la température des constantes de Michaelis K_{m_N} et K_{m_D} semble donc une des façons de soumettre à l'expérience cette hypothèse de Linderstrøm-Lang.

2.22 Dénaturation par l'enzyme protéolytique.

A la suite de nombreux travaux du groupe de Carlsberg, Linderstrøm-Lang [40] a été amené à penser que la réaction de dénaturation pourrait être, elle-aussi, catalysée par la protéase qui jouerait successivement le rôle de dénaturase et d'endopeptidase. Les expériences qui l'ont amené à cette hypothèse sont les suivantes:

1. Les valeurs de la contraction due à l'apparition de charges électriques nouvelles lors de la rupture des liaisons peptidiques sont environ deux fois plus grandes en début d'hydrolyse pour les protéines natives que pour les protéines dénaturées et les dipeptides [42].

2. Les agents dénaturants comme l'urée favorisent la protéolyse [16].

3. Christensen [16] a mis en évidence la formation de produits intermédiaires qui s'accumulent lentement pendant la première partie de la réaction et qui ont les propriétés (viscosité, pouvoir rotatoire, précipitation au point isoélectrique) des protéines dénaturées.

Selon cette conception, la protéine native existe sous plusieurs formes en équilibre, la trypsine attaque l'une d'entre elles en provoquant la rupture de nombreuses liaisons secondaires mais sans rupture de liaisons peptidiques, cette forme "dénaturée" est coupée par la suite.

Si nous nous reportons à la discussion faite au § 2.22, on peut considérer que le produit de la première réaction est la forme "dénaturée".

Si cette première réaction est très rapide par rapport à la dégradation ultérieure de la forme dénaturée, les constantes de Michaelis et les énergies d'activation déterminées seront celles de cette forme dénaturée intermédiaire. Mais si la vitesse du processus de dénaturation n'est pas beaucoup plus grande, la constante de Michaelis déterminée expérimentalement par étude des variations de vitesse de réaction en fonction de la concentration en protéine native, sera une fonction complexe des différentes constantes de vitesse et d'affinité des réactions de dénaturation et de coupure de la forme dénaturée et ne seront pas interprétables.

Enfin, lorsque le processus de dénaturation est un processus lent par rapport aux réactions suivantes, il sera possible, comme nous l'avons vu, d'interpréter les mesures de vitesses globales de protéolyse.

* * *

II - METHODES - PREPARATIONS

1. METHODES DE MESURE DES VITESSES DE PROTEOLYSE.

On ne connaît pas de méthodes précises qui permettent de suivre la disparition du substrat protéique. Seule la méthode par précipitation trichloracétique (TCA) de la protéine non dégradée, proposée par Northrop et Kunitz [51] a tenté d'atteindre ce résultat. Mais elle est, dès à présent, très contestée, surtout depuis que l'on a mis en évidence [11] le fait qu'un certain nombre de produits de dégradation précipitaient en même temps que la fraction protéique. La solubilité de ces produits intermédiaires dépend de leur poids moléculaire et de la concentration en TCA ; ainsi, Boulanger et Bizerte [6] ont fractionné des hydrolysats d'après le poids moléculaire des polypeptides. Il semble que la validité de la méthode par précipitation trichloracétique dépende beaucoup des protéolyses étudiées, et en particulier des facteurs qui influent sur la formation des produits intermédiaires de haut poids moléculaire, par exemple, le pH, le milieu, la protéine étudiée et l'enzyme.

Les méthodes les plus fréquemment utilisées sont les méthodes de titrage des liaisons peptidiques détruites, en milieu alcool, formol ou acétone. Nous en avons employé deux dont nous donnons le principe, la technique, la précision et les limites d'utilisation. Elles permettent de mesurer la somme des vitesses d'attaque du substrat protéique et des produits intermédiaires formés. C'est pourquoi on considère généralement qu'elles ne sont pas valables (Northrop et Kunitz [51]).

Nous avons examiné dans la première partie (cf. I, § 2.2) la relation entre les vitesses ainsi mesurées et la vitesse d'attaque de la protéine, nous avons montré que lorsque le processus le plus lent dans la chaîne de dégradation est le processus d'attaque de la protéine, et

qu'on est à l'état stationnaire, la vitesse mesurée par titrage des liaisons peptidiques détruites est numériquement égale à N fois la vitesse de disparition de la protéine (exprimée en mole); N étant le nombre de liaisons peptidiques rompues par molécule de protéine attaquée.

On se trouve pratiquement à l'état stationnaire quand la variation de concentration des produits intermédiaires de la chaîne de dégradation est très petite par rapport à la variation de concentration du substrat initial S .

La vitesse d'accumulation du produit terminal (ou de la somme des produits terminaux) est alors complémentaire de la vitesse de disparition du substrat protéique. Nous appelons produit terminal celui qui précède dans la série de réactions successives le premier processus lent par rapport au processus d'attaque de la protéine.

Nous avons essayé de voir s'il était possible de montrer dans nos conditions expérimentales:

1) que les vitesses d'attaque de la protéine sont proportionnelles aux vitesses mesurées par titrage des liaisons peptidiques rompues.

2) que l'état est stationnaire; c'est-à-dire que la concentration des produits intermédiaires n'évolue pas rapidement par rapport à celle du substrat initial et des produits terminaux.

Théoriquement, si une seule de ces conditions est réalisée, celle-ci suffit à justifier l'utilisation des méthodes de titrage des liaisons peptidiques détruites.

Nous avons abordé ce problème de trois façons:

A. par comparaison des résultats obtenus en titrant les liaisons peptidiques détruites avec ceux obtenus par la méthode trichloracétique.

B. par analyse d'hydrolysats dont la protéolyse a été arrêtée par addition d'acide ou d'inhibiteur, à des temps variables t , au moyen des techniques d'électrophorèse sur papier et d'ultracentrifugation. Nous avons examiné la composition de ces hydrolysats et cherché à voir si on peut, ou non, observer des produits intermédiaires dont la concentration varie avec des vitesses comparables à celle du substrat protéique.

C. par analyse quantitative d'hydrolysats avec les mêmes techniques. Sur les diagrammes du type classique (donnant la concentration

des différents composants en fonction de la distance à une ligne de repère), on peut mesurer la concentration de la protéine non hydrolysée par la surface comprise entre la ligne de base et la pointe correspondante. Celle-ci est caractérisée par sa mobilité ou sa vitesse de sédimentation. On peut analyser ainsi des parties aliquotes prélevées à des temps variables dans un mélange trypsine-lactoglobuline et placées dans des conditions dans lesquelles la protéolyse n'évolue plus, suivre la vitesse de disparition du substrat protéique et comparer ces résultats avec le titrage des liaisons peptidiques détruites.

1.2 Titration des groupes carboxyliques apparus en milieu acétonique.

Cette méthode a été proposée par Linderström-Lang pour l'étude des réactions d'hydrolyse. Elle a été utilisée surtout par le groupe de Carlsberg.

1.21 Principe: Alors que le dosage des groupes CO_2^- en milieu aqueux est difficile et incomplet à cause de la forte dissociation des acides carboxyliques, il est très facile en milieu acétonique: en effet, par diminution de la constante diélectrique du milieu, la force d'attraction entre les ions CO_2^- et H^+ est augmentée, la dissociation du groupe CO_2H est moins forte et le $\text{pK} = \log \frac{(\text{CO}_2\text{H})}{(\text{CO}_2^-)(\text{H}^+)}$ est déplacé vers un pH plus alcalin. Le point final de titrage est alors situé vers pH 4,5; l'indicateur rouge naphthyl convient parfaitement pour cette zone de virage.

Comme l'acidité des groupes carboxyles dépend beaucoup des radicaux substitués sur le carbone α , les groupes dont le pK est trop faible en milieu acétonique par rapport au pH de virage ne sont pas titrés; mais leur proportion est minime: Jacobsen [31] a montré qu'en augmentant de 16 % la quantité d'acide ajoutée après le point de virage, on ne titrait que 0,3 (sur 45) groupes supplémentaires par molécule de lactoglobuline. On peut admettre que le nombre de groupes titrés est égal au nombre de liaisons peptidiques rompues.

Nous avons tracé la courbe de titrage électrométrique de la lactoglobuline en milieu acétonique et nous avons porté ces résultats sur la

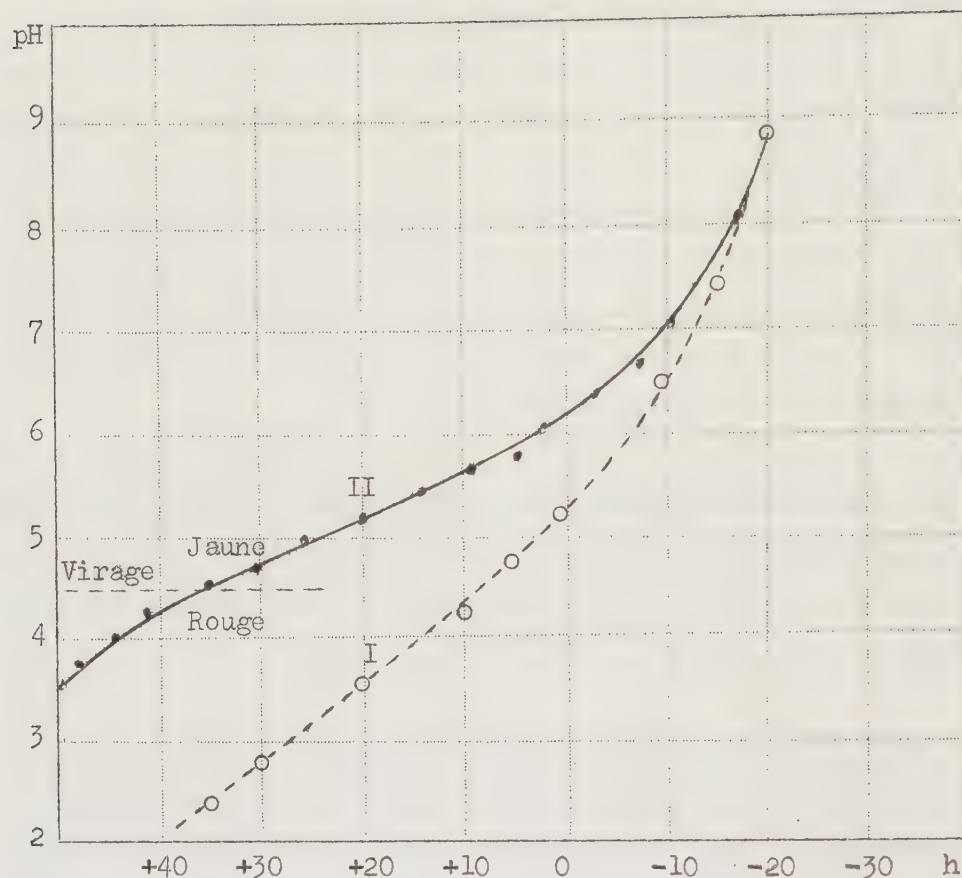


Figure 2. Courbes de titrage électrométrique de la lactoglobuline en milieu aqueux (d'après Cannan et al.[12]) et en milieu acétonique.

En abscisses: équivalents d'acide (valeurs positives) ou de soude (valeurs négatives) ajoutés à la lactoglobuline dissoute en NaCl 0,1 N, calculés sur la base d'un poids moléculaire de 40.000.

En ordonnées: pH de la solution.

Courbe I : milieu NaCl 0,019 M.

Courbe II : milieu NaCl 0,03 N, acétone 70 %.

figure 2 comparativement avec les données de Cannan, Palmer et Kybrick [12] en milieu aqueux, pour une force ionique voisine. On voit que le même nombre de groupes sont titrés entre pH 8 et 4,5 en milieu acétonique et 8,0 et 2,3 en milieu aqueux.

1.22 Technique expérimentale: Elle a été décrite avec beaucoup de détails théoriques et pratiques [39,42], nous n'avons pas fait de modifi-

cations depuis la description faite dans une publication antérieure, en collaboration avec Yon [36]. Tous les échantillons étaient parfaitement clairs dans la zone de virage.

1.23 Critique: L'inconvénient de cette méthode, inconvénient qui la fait rarement utiliser avec des enzymes comme la trypsine dont le pH optimum est alcalin, est le nombre considérable de groupes alcalins à titrer sur la solution témoin non hydrolysée: ce sont les groupes basiques CO_2^- de la lactoglobuline native: 45 à 50 équivalents par molécule selon le pH de protéolyse, plus les groupes basiques du tampon borate. La protéolyse se manifestera par un faible accroissement du nombre de groupes titrés.

Par exemple, pour amener à la couleur de virage une solution de β -lactoglobuline native à 7,5 mg/cm³, en milieu tampon borate M/10, pH 8,0, on ajoutera environ 260 mm³ de HCl 0,1 N. Au cours de la protéolyse, on observera les accroissements suivants ($c = 18 \text{ g/cm}^3$, $t = 35^\circ\text{C}$): 3 mm³ en 5 minutes, 6 mm³ en 10 minutes, etc. La réaction sera ainsi suivie par 5 ou 6 dosages en 20 minutes. On voit que pour avoir une précision de 10 % sur le nombre de groupes apparus au point 5 minutes, il faut avoir une précision de 1/1000 de cm³ sur la valeur du titrage correspondant. On augmente au maximum la précision sur les vitesses initiales en choisissant des concentrations en trypsine pour lesquelles la vitesse est constante pendant 20 minutes environ, et en multipliant le nombre des points pendant cet intervalle de temps; en travaillant dans un milieu peu tamponné entre le pH de protéolyse et le pH de virage; c'est pourquoi nous avons constamment utilisé avec cette méthode des tampons borate à l'exclusion des tampons phosphate. Remarquons qu'il est nécessaire d'opérer dans un milieu suffisamment tamponné pour que l'acidification du milieu dû à la protéolyse ne diminue pas de façon sensible la vitesse de réaction.

Pour des concentrations en lactoglobuline inférieures à 2 ou 3 mg/cm³, la précision devient très mauvaise.

1.3 Titrage continu des groupes α -ammonium apparus.

Cette méthode consiste à mesurer la quantité de soude ajoutée en fonction du temps pour maintenir constant le pH d'une solution en cours de protéolyse.

On avait utilisé jusqu'à présent ce procédé pour étudier les réactions dans lesquelles un ion acide relativement fort était libéré, par exemple pour suivre l'activité estérase des enzymes protéolytiques: on dosait ainsi par la soude le nombre de groupes acides libérés.

Waley et Watson [66] l'ont utilisé les premiers pour suivre la coupure de liaisons peptidiques d'une chaîne polypeptidique; la polylysine.

1.31 Principe: La liaison CO-NH, par fixation d'une molécule d'eau et coupure donne COO^- et NH_3^+ , sans prendre ni céder de proton au milieu. Si on est placé à un pH compris entre le pK du groupe carboxyl et celui du groupe ammonium, ces pK étant suffisamment éloignés, le système sera stable et la coupure d'une liaison peptidique n'entraînera aucun changement dans le pH du milieu. Mais si on est placé, par exemple, à un pH où la forme NH_2 est seule stable, c'est-à-dire à un pH bien supérieur au pK du groupe ammonium, le groupe NH_3 formé libérera un ion H^+ pour donner NH_2 et le milieu deviendra plus acide: en ajoutant de la soude pour maintenir le pH constant, on dosera exactement le nombre de groupes H^+ libérés. A un pH voisin du pK, une partie seulement des ions NH_3^+ se transformeront en NH_2 , on ne dosera qu'une fraction des liaisons peptidiques détruites.

1.32 Pourcentage des groupes titrés.

Waley et Watson ont montré que si un polypeptide dont le groupe ammonium terminal a une constante de dissociation K_2 , est hydrolysé, si K_2 , modifié par suite du changement de taille du peptide devient K'_2 , si enfin K_1 est la constante de dissociation du nouveau groupe α -ammonium apparu par suite de la rupture de la liaison peptidique, le rapport de la quantité de soude ajoutée (NaOH) au nombre de liaisons peptidiques coupées (LP) est:

$$\frac{(\text{NaOH})}{(\text{LP})} = \frac{K_1}{K_1 + (\text{H}^+)} + \frac{K'_2}{K'_2 + (\text{H}^+)} - \frac{K_2}{K_2 + (\text{H}^+)}$$

(H^+) étant la concentration en ions hydrogène.

Ils concluent que ce facteur de proportionnalité n'est calculable que pour les peptides simples.

En première approximation, on peut dire que cette fraction est égale à $\frac{K}{K + (\text{H}^+)}$, K étant la constante de dissociation du groupe α -ammonium libéré.

$(\text{NaOH})/(\text{LP})$ sera donc égal à l'unité lorsque $K \gg (\text{H}^+)$, c'est-à-dire lorsque $\text{pH} > \text{pK}$. Avec une différence d'une unité de pH, on dosera les 9/10 des groupes libérés; on en dosera 99/100 avec une différence de 2 unités de pH. Lorsque $\text{pH} = \text{pK}$, $\frac{(\text{NaOH})}{(\text{LP})} = \frac{1}{2}$.

1.33 Application à la mesure de protéolyse des protéines.

Nous avons essayé d'employer cette méthode pour suivre la protéolyse de la lactoglobuline en milieu peu tamponné. Il est évident que le facteur de proportionnalité ne pourra pas être calculé a priori pour une protéine, mais il n'est pas nécessaire de le connaître pour faire une étude comparative au même pH, des variations de vitesse d'hydrolyse sous l'influence d'autres facteurs.

A pH 8,0, nous avons constaté, en comparant les vitesses de protéolyse avec celles obtenues par la méthode de Linderström-Lang que le nombre de liaisons peptidiques coupées titrées était le même dans les deux cas (cf. II, § 1.4). Le fait que le facteur de proportionnalité soit voisin de l'unité peut paraître surprenant étant donné le pK élevé des groupes α -ammonium, pK qui varie entre 9 et 10 pour les acides aminés, 8,1 à 8,5 pour les dipeptides.

Il est connu que ce pK diminue quand la grandeur du peptide augmente et qu'il est compris entre 7,6 et 8,4 pour les protéines d'après Cohn et Edsall [17], entre 6 et 8 d'après Klotz [35].

1.34 Technique.

Nous nous sommes servis d'une installation identique à celle décrite

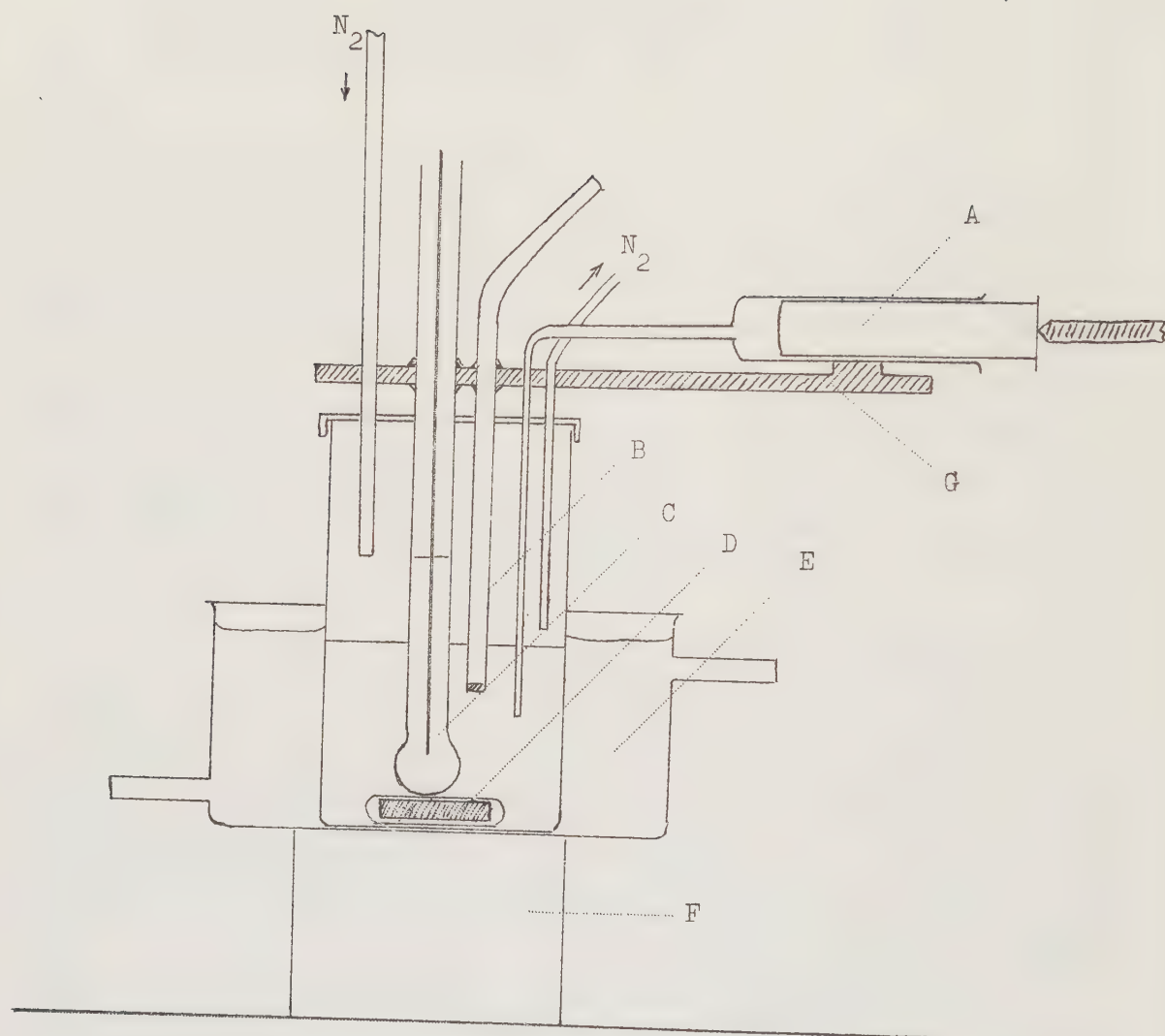


Figure 3.

Dispositif expérimental pour l'étude de la protéolyse
par la méthode continue.

- A : microseringue "Agla".
- B : électrode au calomel.
- C : électrode de verre.
- D : fil d'acier enrobé de verre.
- E : bain à température constante.
- F : agitateur à aimant tournant.
- G : support monté sur crémaillère .

par Waley et Watson (figure 3).

La cuve cylindrique qui contient la solution étudiée (diamètre 25 mm, hauteur 45 mm) est placée dans un récipient en verre où circule de l'eau thermostatée au $2/100^{\circ}$ de degré. Elle contient une aiguille de fer enrobée de verre. Le tout est placé sur un agitateur magnétique.

Les électrodes, verre et calomel, la microseringue "agla" et le tube d'arrivée d'azote sont solidaires et montés sur un support à crémaillère.

Nous employons un pHmètre Philips (dont l'amplification est faite en alternatif de sorte qu'il n'y a pas de dérive du zéro). Pourtant le zéro, l'étalonnage par rapport au Weston et le potentiel d'assymétrie de l'électrode de verre sont vérifiés avant et après chaque mesure de vitesse de protéolyse; l'écart de pH n'excède jamais 0,03 unités de pH.

Le réglage du potentiel d'assymétrie est fait par rapport à un tampon phosphate (étalonné à l'électrode d'hydrogène), amené à la même température que la solution à mesurer, après avoir laissé l'électrode au calomel atteindre son équilibre de température. Toute l'installation est placée dans une armoire métallique mise à la masse, cette précaution a été indispensable, des parasites gênant considérablement l'observation de l'appareil de zéro du pHmètre (oeil cathodique).

Des prises de 8 à 15 cm³ de la solution de lactoglobuline à étudier sont placées dans la cuve de mesure; les électrodes sont mises en place en agissant sur la vis du support à crémaillère. Après la mise en marche de l'agitation magnétique, on fait passer un faible courant d'azote; et on laisse la température s'équilibrer avec celle du thermostat (5 minutes). On amène le pH à 8,00 par addition de NaOH 0,1 N à la microseringue "agla"; après 5 à 20 minutes d'attente pendant lesquelles on observe la stabilité du pH, on ajoute la trypsine (0,155 cm³ généralement, avec une pipette à striction) en déclenchant le chronomètre. Une certaine quantité de NaOH 0,1 N est ajoutée alors à la microseringue de manière à avoir un pH légèrement plus alcalin que le pH fixé (d'environ 0,02 pH): la plage foncée de l'oeil cathodique n'est plus au maximum, on note le moment où elle passe au maximum. Généralement, nous n'avons pas déterminé avec précision le point zéro; une petite quantité de soude

servant toujours à la neutralisation de la trypsine acide ajoutée, le premier point est généralement obtenu 40 à 50 secondes après le début de la réaction. Celle-ci est suivie pendant 5 à 15 minutes avec une dizaine de pointés. Les tracés mm³ de soude ajoutés en fonction du temps sont absolument linéaires quand les concentrations en trypsine sont correctement choisies et donnent une grande précision sur les vitesses initiales (voir figures 17 et 19)(cf.III, § 1.4) que nous exprimons en mm³ de soude 0,1 N par minute par cm³ de solution par γ /cm³ de trypsine. 1 mm³ de soude 0,1 N est équivalent à 10^{-7} LP détruites.

1.35 Critique. Précision.

Il est nécessaire de travailler en milieu peu tamponné; généralement nous avons utilisé un milieu NaCl 0,1 N, nous avons encore une très bonne précision en milieu (acide borique-NaCl) M/20-NaOH. Pratiquement, il est possible d'obtenir des résultats reproductibles à 1 % près.

1.4 Comparaison expérimentale de la méthode de titrage en milieu acétonique avec la méthode continue.

Il semble, d'après ce que nous avons vu aux §§ 1.21 et 1.33, que le nombre de groupes titrés par la méthode de Linderström-Lang soit égal au nombre de liaisons peptidiques coupées (LP) tandis que la méthode potentiométrique continue ne permet de connaître ce nombre qu'à un facteur près, lorsque le pH n'est pas très alcalin par rapport au pK des groupes ammonium libérés.

Pour déterminer ce facteur (NaOH)/(LP), lorsque le pH de mesure est 8,0, nous avons d'abord comparé directement, dans les mêmes conditions, la réaction mesurée par les deux méthodes sur deux parties aliquotes d'une même solution de lactoglobuline dissoute en tampon borate M/20 et amenée à pH 8,00 (figure 4); d'autre part, nous avons mesuré au même pH le nombre de groupes titrés lors d'une hydrolyse très avancée d'une solution de lactoglobuline en milieu NaCl 0,1 N et tampon borate M/20.

La figure 5 (page 32) montre une cinétique de protéolyse à pH 8,0 (résultats concordants de deux expériences) suivie pendant 120 minutes:

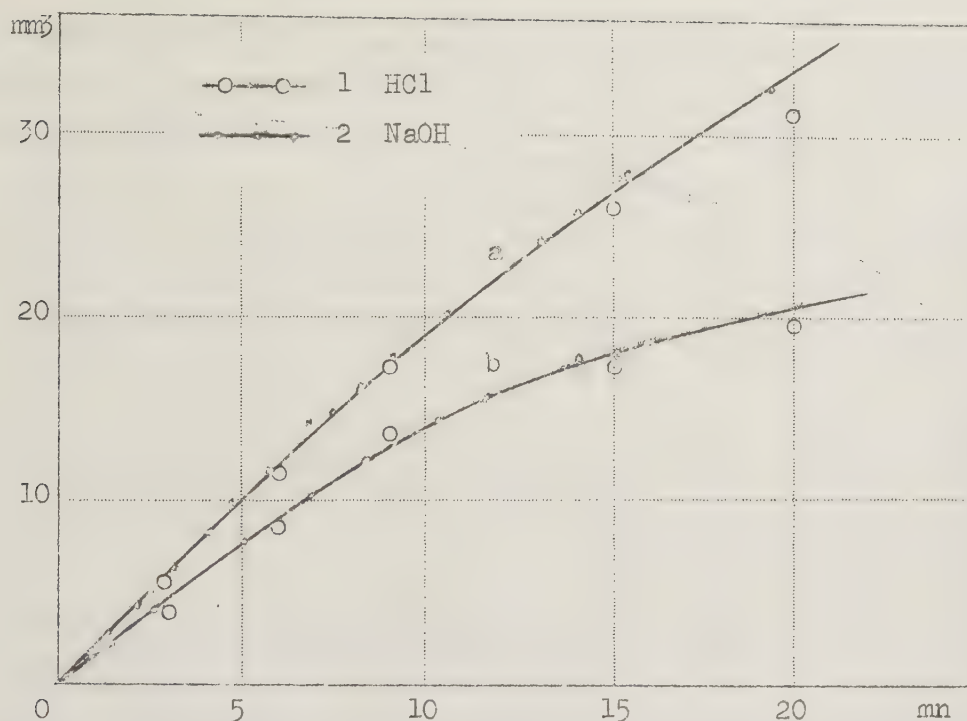


Figure 4. Comparaison des méthodes de titrage des liaisons peptidiques en milieu acétonique et par la méthode continue.

En abscisses: temps écoulé depuis l'addition de trypsine.

En ordonnées: nombre de mm³ 1: de ClH alcoolique N/10 (pour titrer les groupes CO₂ apparus en milieu acétonique)
2: de NaOH N/10 (pour titrer les groupes NH₂ apparus par la méthode continue)
ajoutés à 1 cm³ d'hydrolysate.

Lactoglobuline native : courbe a : $s = 10 \text{ mg/cm}^3$

courbe b : $s = 3,6 \text{ mg/cm}^3$

Trypsine : $e = 30 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$; tampon borate M/20; pH 8,0; 35°C.

à ce moment, 30 équivalents de NaOH ont été ajoutés (calculés sur la base d'un poids moléculaire de 38.000 pour la lactoglobuline); la fraction précipitable par TCA est encore de 18 %. En admettant en première approximation que cette fraction est composée de protéine intacte, cela ferait $30 \times 100/82 = 36$ groupes titrés par molécule. Ce chiffre est peu différent de celui de Miller [47] qui trouve 33 à 35 groupes par la méthode de Linderström-Lang, calculés sur la base d'un poids moléculaire de 39.000, après une hydrolyse de 72 heures à pH 8,3, avec $70 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$ de trypsine. Une nouvelle addition de trypsine ne fait pas évoluer

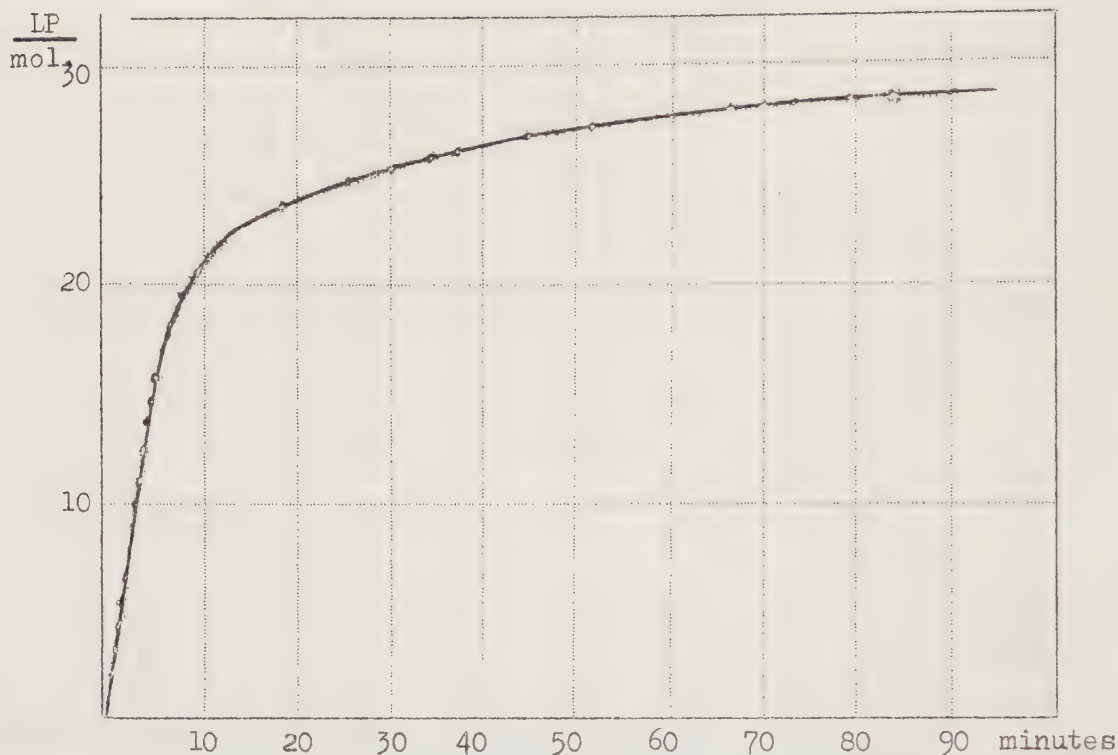


Figure 5. Nombre de groupes titrés par la méthode continue au cours de la protéolyse de la lactoglobuline native.

En abscisses: temps écoulé depuis l'addition de trypsine.

En ordonnées: nombre moyen de liaisons peptidiques détruites, divisé par la concentration molaire initiale de lactoglobuline.

Lactoglobuline 5 mg/cm³; pH 8,0, 35°C, NaCl 0,1 N.

La quantité précipitable après 130 minutes de protéolyse par TCA 5 %, représente 18 % de la quantité initiale de lactoglobuline.

davantage la protéolyse.

1.5 Méthode trichloracétique.

1.51 Principe: Northrop et Kunitz [51] ont proposé de suivre l'hydrolyse de la caséine par la trypsine en dosant sur des parties aliquotes prélevés à des intervalles de temps réguliers, la fraction précipitable en milieu 5 % trichloracétique: ils considèrent que cette fraction représente la protéine non hydrolysée, ils la mesurent par dosage de l'azote protéique du précipité après lavage soigné. Actuellement la tech-

nique utilisée [52], beaucoup plus rapide, consiste à centrifuger le précipité, et à doser dans le surnageant la concentration des produits absorbant la lumière ultraviolette à 280 mμ au spectrophotomètre.

On sait maintenant que la fraction précipitée contient non seulement la protéine intacte, mais aussi des polypeptides de poids moléculaire assez faible ; comme l'ont montré Butler et ses collaborateurs [11], dans un hydrolysât d'insuline, le poids moléculaire moyen déterminé par diffusion est de l'ordre de 4.000 pour le précipité et 800 pour le surnageant. Jacobsen [32] indique qu'en milieu 20 % acétonique, la précipitation est beaucoup plus spécifique de la protéine qu'en milieu aqueux, la fraction non précipitée étant deux fois plus forte dans le premier cas.

1.52 Variation des vitesses d'apparition des produits solubles avec les concentrations en lactoglobuline.

Nous avons étudié par mesure de la densité optique du surnageant après centrifugation du précipité trichloracétique, les vitesses d'apparition des produits solubles à 22° et 35°C, en NaCl 0,1 N et tampon borate M/20, à pH 8,0. On déterminait simultanément, en adaptant la méthode continue, le nombre de liaisons peptidiques détruites, de manière à pouvoir comparer les deux méthodes.

Techniques.

Précipitation: A des prises de 1 cm³ de l'hydrolysât à doser, on ajoute 4 cm³ d'une solution d'acide trichloracétique (TCA) 5 % (poids par volume), 30 % alcoolique [70]; après une bonne agitation, les échantillons sont abandonnés 1 à 3 heures à la température de la pièce, puis centrifugés à 15.000 tours par minute pendant 30 minutes. Le surnageant est prélevé à la pipette. Ces solutions sont claires et ne se troublent pas lorsqu'elles sont laissées quelques heures, même une nuit à la température de la pièce. Par contre, elles se troublent si elles sont mises à la glacière. La concentration des produits solubles du surnageant est mesurée au spectrophotomètre à 280 mμ. Nous avons vérifié que le coefficient d'absorption spécifique n'était pas modifié en milieu trichloracétique.

Protéolyse: 15 cm³ d'une solution de lactoglobuline, dissoute dans le milieu choisi, sont placés dans la cuve thermostatée utilisée dans la méthode potentiométrique continue (cf. § 1.34); lorsque l'équilibre de température est établi, le pH est ajusté à 8,0 par addition de NaOH 0,1 N. Au temps zéro, on ajoute 0,155 cm³ de trypsine; le pH est maintenu constant par addition de soude à la microsiringue, on fait aux temps "t" des prélèvements de 1 cm³ qui sont précipités comme nous l'indiquons au paragraphe précédent. D'autre part, on note les quantités de soude ajoutées en fonction du temps; corrigées de la variation de volume total résultant des prélèvements, ces lectures permettent d'estimer les valeurs des vitesses de réaction par la méthode continue, avec une erreur maxima de 10 % environ.

On fait trois prélèvements témoins correspondant au temps zéro, avant l'addition de trypsine.

Résultats: La figure 6 montre les courbes de protéolyse avec différentes concentrations en lactoglobuline: à 35° en milieu NaCl 0,1 N, la vitesse de réaction ne varie pas avec la concentration de lactoglobuline; en tampon borate M/20, les vitesses diminuent lorsque ces concentrations augmentent. D'autre part les vitesses, sensiblement constantes dans l'intervalle 5-15 minutes, sont au début plus faibles et augmentent lentement jusqu'à leur valeur de régime; Christensen a noté récemment avec la caséine cet effet d'augmentation progressive des vitesses de réaction mesurée par la méthode trichloracétique.

A 22°C, l'aspect général est le même, mais les débuts d'hydrolyse sont linéaires quelles que soient les concentrations en lactoglobuline.

Les résultats sont très différents de ceux obtenus par titrage des liaisons peptidiques détruites.

On trouve en effet, par cette dernière méthode, des vitesses qui augmentent avec la concentration (s mg/cm³) en lactoglobuline suivant la loi $v = \frac{k_2 s}{3 + s}$ (cf. III, §.1.611).

A pH 7,0, en milieu tampon borate M/5, Yon [71] a trouvé la même constante de Michaelis avec la méthode trichloracétique qu'avec la méthode de titrage des liaisons peptidiques de Linderström-Lang.

Pour interpréter la différence des résultats obtenus par les deux

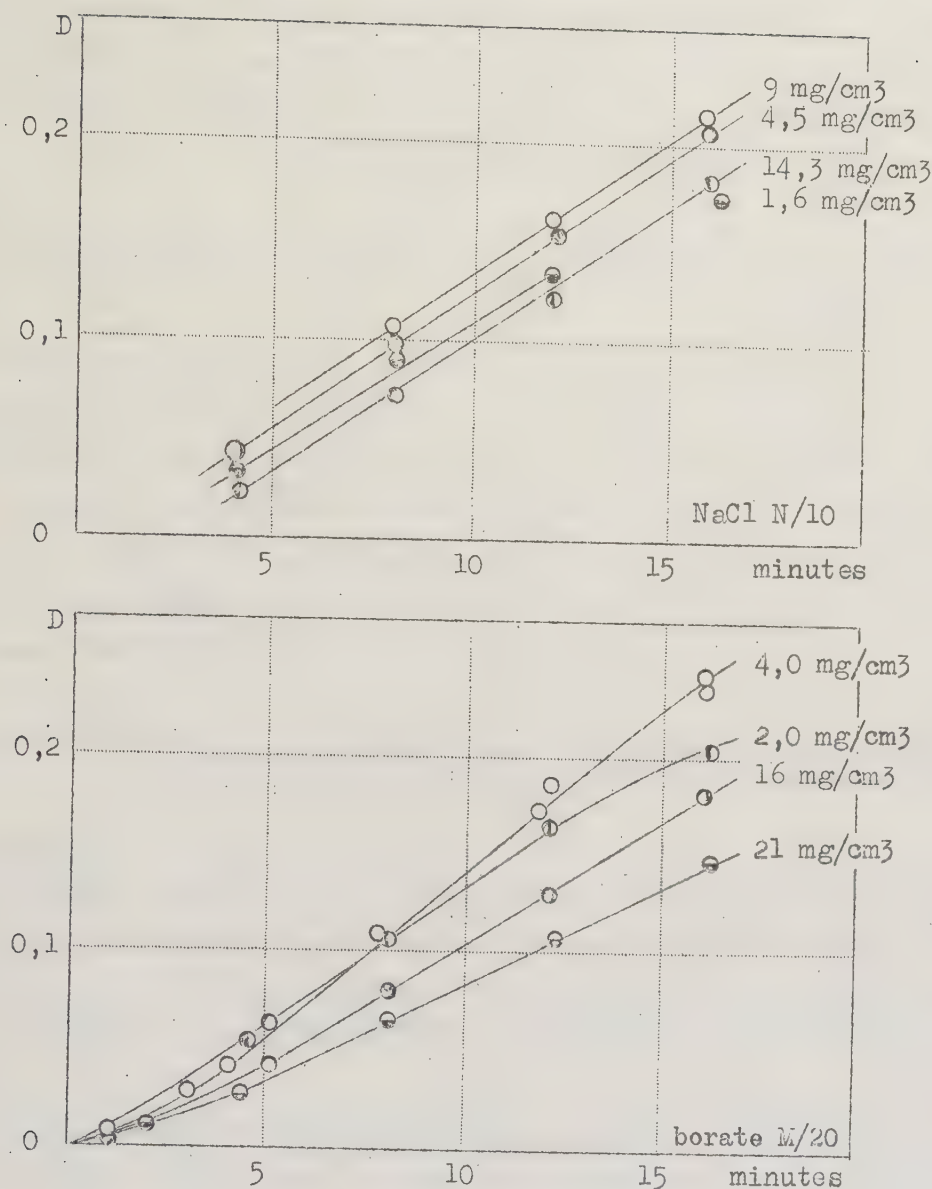


Figure 6.

Vitesse de protéolyse mesurée par la méthode trichloracétique, pour différentes concentrations en lactoglobuline.

En abscisses: Temps écoulé depuis l'addition de trypsine.
En ordonnées: Densité optique à 280 mμ du surnageant (après centrifugation) d'un mélange de 4 cm³ de TCA 5 % alcoolique avec 1 cm³ de l'hydrolysât.

Protéolyse: Lactoglobuline native: concentration variable indiquée sur chaque courbe; trypsine e = 27 γ/cm³; 35°C; pH 8,0. En haut: NaCl N/10. En bas: tampon borate M/20.

méthodes, il semble qu'il faut voir s'il n'y a pas simplement dans la méthode TCA entraînement de la fraction soluble par le précipité, d'autant plus important que ce précipité est plus abondant, c'est-à-dire que la concentration en lactoglobuline est plus forte.

1.53 Variation de la fraction en solution avec la concentration du précipité.

Pour examiner cette possibilité, nous avons étudié l'évolution en fonction du temps d'un hydrolysât; nous mesurons la vitesse de protéolyse avec différentes techniques de précipitation de manière à faire varier la concentration du précipité dans le mélange précipitant:

1er mélange précipitant: 1 cm³ d'hydrolysât, 4 cm³ de TCA 5 % (alcoolique);

2me mélange précipitant: 1 cm³ d'hydrolysât (concentration H en lactoglobuline, 1 cm³ de lactoglobuline (concentration L); 8 cm³ de TCA 5 % (alcoolique);

3me mélange précipitant: 0,185 cm³ d'hydrolysât, 0,815 cm³ de CHCl₃ 0,1N, 4cm³ de TCA 5 % (alcoolique).

Les figures 7 et 8 (page 38) montrent les résultats de telles expériences: P ou concentration du précipité dans le mélange précipitant est égal à $(H+L)/10$; la concentration des produits solubles de l'hydrolysât est mesurée par la densité optique D du mélange après centrifugation dans la méthode 1, par $2 \times D$ dans la méthode 2; par $D : 0,185$ dans la méthode 3.

Les témoins faits avec des concentrations variables en protéine montrent que la lactoglobuline elle-même est entièrement précipitée quelle que soit sa concentration.

On voit que la vitesse apparente de protéolyse est d'autant plus grande que la concentration P du précipité protéique est faible. Les écarts sont plus ou moins accentués suivant le milieu dans lequel s'est fait la protéolyse: l'influence de la concentration du précipité est très faible dans les conditions d'hydrolyse: pH 7,0, 35°, borate M/5. Elle est nulle à pH 8,0, 35°, NaCl 0,1 N en début d'hydrolyse. Elle est grande pour pH 8,0, 35°, borate M/20.

Remarquons que le milieu peut agir en modifiant:

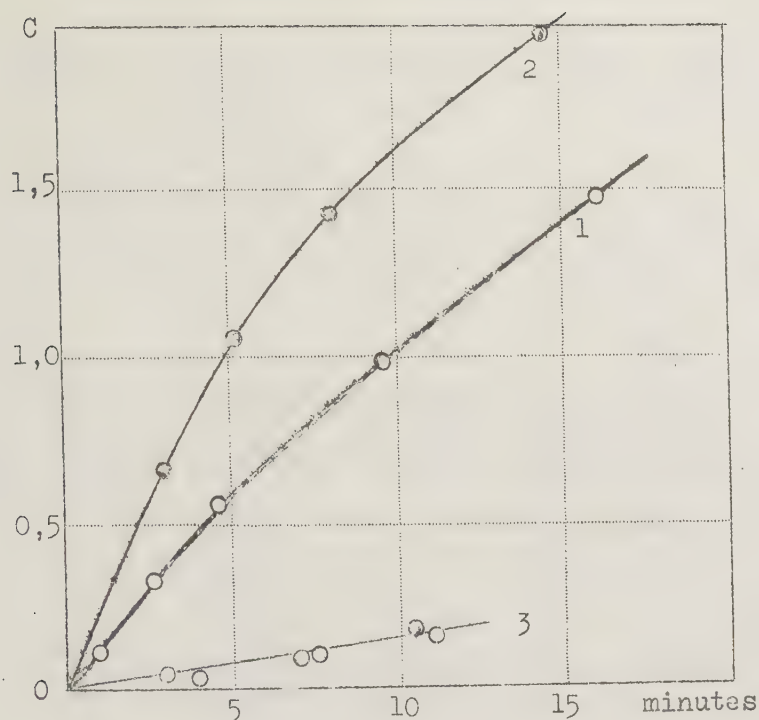


Figure 7. Variation de la concentration des produits de l'hydrolysate non précipités par TCA avec la concentration du précipité P dans le mélange précipitant.

En abscisses: durée d'hydrolyse en minutes.

En ordonnées: concentration des produits de l'hydrolysate solubles dans TCA 4 %, en unités arbitraires (densité optique D_{280} du surnageant après centrifugation de 1 cm³ d'hydrolysate avec 4 cm³ de TCA.

Hydrolyse: à pH 8,0, en NaCl 0,1 N, de lactoglobuline 24 mg/cm³, par la trypsine à la concentration $e = 20 \gamma/\text{cm}^3$: courbe 3
 $e = 330 \gamma/\text{cm}^3$: courbes 1 et 2.

Mélange précipitant:

points clairs: 1 cm³ d'hydrolysate, 4 cm³ de TCA 5 %

points foncés: 0,185 cm³ d'hydrolysate, 0,815 cm³ NaCl 0,1 N, 4 cm³ TCA 5%

- soit la formation d'éventuels produits intermédiaires dans les hydrolysats,

- soit la solubilité ou le pouvoir adsorbant de ces produits intermédiaires.

Nous n'avons pas fait d'expérience qui permette de préciser quel est le mécanisme responsable de ces variations apparentes de vitesse.

Ces résultats suffisent donc à expliquer la diminution apparente des vitesses de réaction avec les concentration en lactoglobuline (décrite au § 1.52) lorsque les protéolyses sont effectuées en borate M/20.

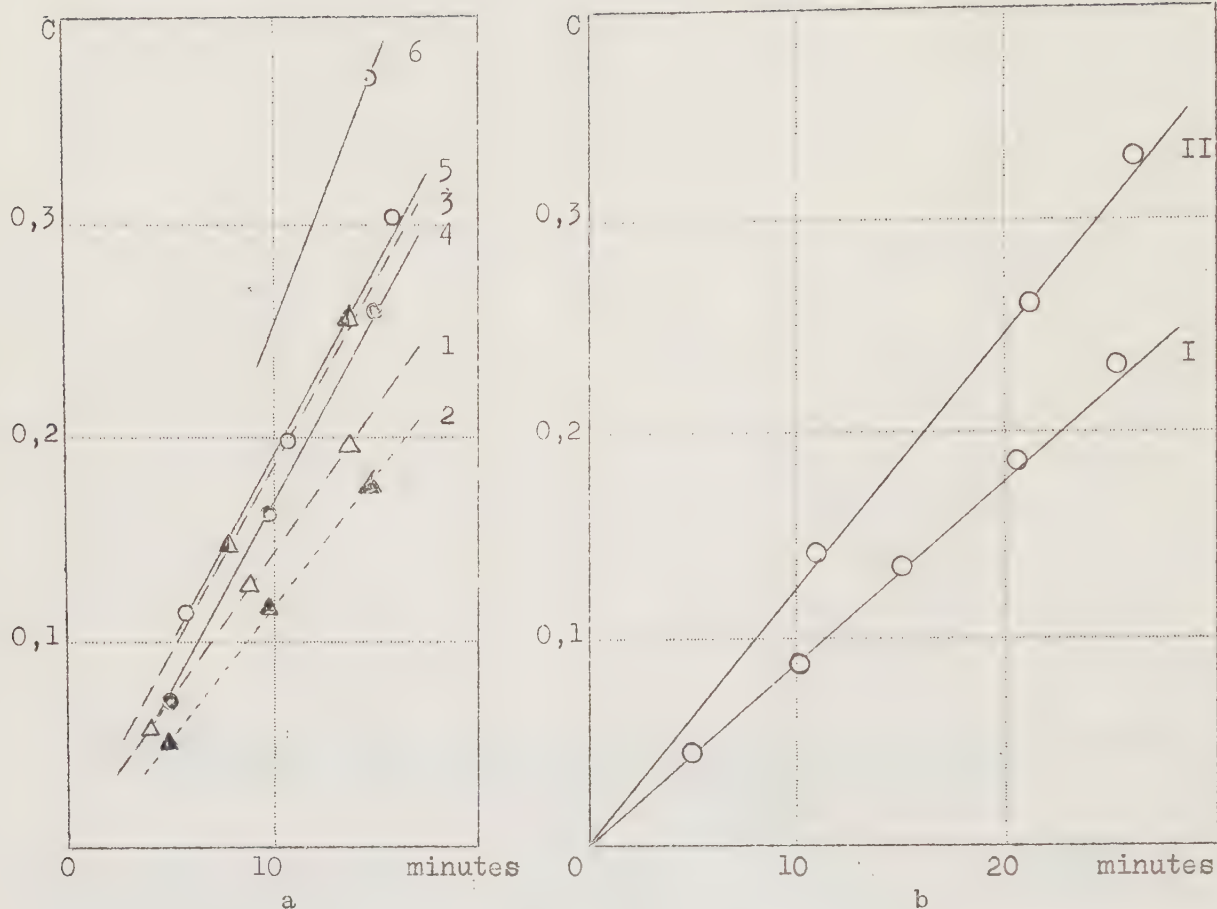


Figure 8.

Variation de la concentration des produits de l'hydrolysate non précipités avec la concentration du précipité protéique: P dans le mélange précipitant.

En abscisses : durée d'hydrolyse en minutes.

En ordonnées : concentration des produits de l'hydrolysate solubles dans TCA 4 %, en unités arbitraires (densité optique D_{280} du mélange, 1 cm³ d'hydrolysate, 4 cm³ de TCA 5 %).

a) Hydrolyse à pH 7,0, en tampon borate M/5, 35°C, par la trypsine ($c = 70 \text{ g/cm}^3$), de lactoglobuline

- 6 mg/cm³ : courbes 1, 2 et 3 pour $P = 1,3$; 2,9 et 0,22 mg/cm³ respectivement;

- 23 mg/cm³ : courbes 4, 5 et 6 pour $P = 4,6$; 2,9 et 0,84 mg/cm³ respectivement.

b) Hydrolyse à pH 8,0, en tampon borate M/20, à 35°C, par la trypsine ($c = 15 \text{ g/cm}^3$) de lactoglobuline 20 mg/cm³ pour $P = 4 \text{ mg/cm}^3$: courbe I, et $P = 2,6 \text{ mg/cm}^3$: courbe II.

(Détails de l'expérience dans le texte.)

Ils sont cohérents avec le fait que Yon [71] trouve les mêmes constantes de Michaelis (pH 7,0, borate M/5) par la méthode trichloracétique et par titrage des liaisons peptidiques détruites.

Dans nos conditions expérimentales, nous avons dû renoncer à utiliser la méthode de précipitation trichloracétique pour étudier la réaction de protéolyse.

1.6. Comparaison de la méthode trichloracétique avec la méthode de titrage continu des liaisons peptidiques détruites.

Jacobsen [40,32] a fait cette étude comparative pour la protéolyse de la lactoglobuline par la trypsine. Il exprime ses résultats en portant en abscisses le nombre de liaisons peptidiques détruites divisé par la concentration initiale en lactoglobuline exprimée en mole, et en ordonnées le pourcentage de produits solubles apparus, pour différents degrés de protéolyse. L'inverse de la pente donne N, nombre de liaisons peptidiques détruites par molécule hydrolysée si la fraction précipitée comprend seulement la protéine intacte. Si des produits de poids moléculaire plus faible sont également précipités, on trouvera pour N des valeurs trop fortes.

Jacobsen a fait les précipitations soit en milieu aqueux, soit en milieu 20 % acétonique, la concentration finale en TCA étant 10 %. En milieu acétonique, il trouve environ 5 liaisons peptidiques détruites par molécule de lactoglobuline hydrolysée, et en milieu aqueux, $N = 5$.

Nous avons étudié un hydrolysat (lactoglobuline 4,5 mg/cm³; trypsine $e = 79 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$, 35°, pH 8,0; tampon borate M/20), les prises . . . étaient précipitées dans deux conditions:

- soit par addition de 4 cm³ de TCA 5 % alcoolique 30 %
- soit par addition de 4 cm³ de TCA 10 % acétonique 25 %, selon Jacobsen.

Dans le premier cas, la concentration des produits solubles est mesurée dans le surnageant, après centrifugation, par mesure de sa densité optique à 280 m μ .

Dans le deuxième, la concentration des produits solubles est mesurée également dans le surnageant, après centrifugation, mais par micro-

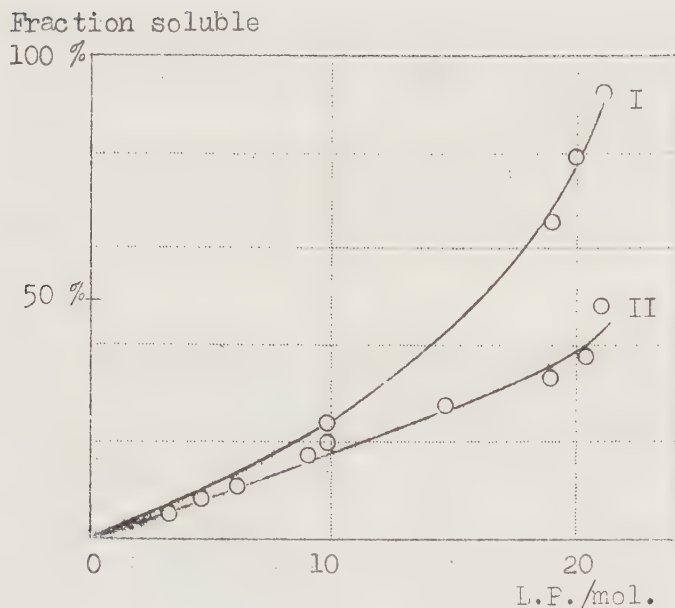


Figure 9.

Comparaison des mesures de protéolyse par la méthode de précipitation trichloracétique, la méthode de titrage des liaisons peptidiques détruites.

En abscisses: nombre de liaisons peptidiques détruites, mesurées par la méthode continue, divisé par la concentration totale en lactoglobuline exprimée en mole ($PM = 38.000$).

En ordonnées: fraction non précipitable dans TCA, mesurée par le rapport de la concentration des produits solubles à la concentration initiale en lactoglobuline (mg/cm^3).

Courbe I : précipitation en milieu TCA 8 %, 20 % acétonique.

Courbe II : précipitation en milieu TCA 4 %, 24 % alcoolique.

dosage d'azote Kjeldahl.

(Pour la minéralisation des prises, l'acétone est éliminé avant l'addition de l'acide sulfurique concentré par un faible chauffage d'environ 20 minutes en milieu acide.)

Nous avons pris comme pourcentage d'azote pour les produits de digestion, le chiffre de 15,6 % donné par Chibnall pour la lactoglobuline[15].

Le nombre de liaisons peptidiques détruites par molécule est calculé sur la base d'un poids moléculaire de 38.000 pour cette protéine.

La figure 9 montre les résultats obtenus en portant en abscisses le nombre de liaisons peptidiques détruites par molécule et en ordonnées le pourcentage non précipité. Celui-ci est calculé en prenant comme coefficient d'extinction pour les produits de digestion en milieu trichloroacétique le même que celui de la lactoglobuline en milieu aqueux, soit $0,96 \text{ cm}^2/\text{mg}$ (nous avons vérifié l'exactitude de cette évaluation).

En milieu acétonique, la fraction précipitée est environ deux fois plus faible qu'en milieu alcoolique. Mais les chiffres trouvés pour N sont beaucoup plus forts que celui de Jacobsen, nous trouvons par mesure de l'inverse de la pente $N = 40$ en milieu acétonique et 50 en milieu alcoolique. Soulignons que ces chiffres n'ont pas de signification en valeur absolue puisque nous avons montré au § 1.53 que le précipité retenait une partie de la fraction soluble.

Puisque l'effet d'adsorption du précipité est d'autant plus grand que la concentration protéique est plus forte, les résultats des expériences décrites au § 1.52, portés en fonction du nombre des liaisons détruites par molécule permet de calculer un nombre N (apparent) d'autant plus grand que la concentration (S) en lactoglobuline est plus forte; ainsi nous trouvons, avec la précipitation alcoolique, $N = 40$ pour $S = 1,9 \text{ mg/cm}^3$, $N = 50$ pour $S = 4,8 \text{ mg/cm}^3$, $N = 80$ pour $S = 16 \text{ mg/cm}^3$, $N = 125$ pour $S = 21 \text{ mg/cm}^3$ (pH 8,0, tampon borate M/20). A pH 7,0, les calculs faits d'après les résultats de Yon [74], en milieu tampon borate M/5, donnent $N = 115$ quelle que soit la concentration en lactoglobuline entre 2 et 20 mg/cm^3 . Ces valeurs trop grandes de N montrent que des produits de la réaction précipitent avec la protéine.

1.7 Etude de l'hydrolyse par électrophorèse sur papier et ultracentrifugation analytique.

Nous avons donc essayé d'étudier la protéolyse trypsique de la lactoglobuline par d'autres méthodes que le titrage des liaisons peptidiques détruites, avec l'idée de suivre réellement la disparition du substrat protéique.

C'est pourquoi nous avons fait l'étude d'hydrolysats correspondant à des degrés variables de protéolyse mesurés par titrage des liaisons peptidiques détruites:

- par électrophorèse sur papier en tampon véronal pH 8,5 d'une part, et en tampon acétate pH 4,5 d'autre part, nous avons recherché la présence de produits intermédiaires, mesuré la mobilité du composant correspondant à la lactoglobuline non hydrolysée et mesuré la concentration de ce composant à partir du relevé photométrique des diagrammes d'électrophorèse sur papier colorés au bleu de bromophénol

- par ultracentrifugation analytique, nous avons mesuré la vitesse de sédimentation du composant lourd et évalué sa concentration, recherché la présence de produits intermédiaires.

1.71 Electrophorèse sur papier.*

La lactoglobuline native déposée sur papier mouillé par une solution tamponnée, migre sous l'influence d'un champ électrique quand le pH diffère du point isoélectrique (pH 5,1) en donnant une bande qu'il est facile de révéler en la colorant soit à la ninhydrine, soit au bleu de bromophénol.

Nous avons essayé de suivre quantitativement la disparition de cette bande lors de l'hydrolyse de cette protéine par la trypsine, en comparant les résultats ainsi obtenus avec ceux de la méthode continue de titrage des liaisons peptidiques rompues. Nous avons cherché à voir si la mobilité de la fraction non dégradée restait constante au cours de la protéolyse ou évoluait constamment.

1.711 Techniques.

a) Protéolyse: Préparation des échantillons pour l'électrophorèse. La protéolyse d'une solution de lactoglobuline 25 mg/cm³, en NaCl 0,1 N, à 35°C, pH 8,0, sous l'action de la trypsine (140 à 280 γ/cm³), est suivie par la méthode continue (cf.II, § 1.34). Avant l'addition de trypsine (temps zéro) et aux temps 2, 4, 6, 10 et 15 minutes, on fait un prélèvement de l'hydrolysate:

- soit avec une micropipette capillaire de précision; la prise,

* Ce travail a été fait en collaboration avec M. de Mende, au Centre d'Electrophorèse du C.N.R.S.

15 mm³, est alors déposée sur papier, mouillé préalablement avec du tampon acétate 4,5, 0,2 M. La protéolyse est ainsi immédiatement arrêtée.

- soit avec une micropipette à striction de 0,470 cm³ et ajoutée à 0,155 cm³ d'une solution d'inhibiteur de la graine de Soja (STI) à 1,65 mg/cm³ (concentration finale: 405 γ/cm³ pour 115 γ/cm³ de trypsine). La protéolyse est ainsi arrêtée. On fait alors sur cette solution la prise de 15 mm³ qui est déposée sur papier mouillé avec le tampon véronal pH 8,5.

b) Electrophorèse: La cuve est en plastique, elle mesure 30 x 30 cm²; elle permet de tendre une feuille de papier suffisamment grande pour faire migrer simultanément six échantillons. Des essais préliminaires ont montré que le champ est homogène et que les résultats obtenus en déposant six parties aliquotes d'une même solution protéique sont indépendants de leur position par rapport aux bords de la cuve. Chaque électrode est constituée par un fil de platine tendu en travers de la cuve. Le papier "Arches 302", après avoir été mis en place et tendu dans la cuve d'électrophorèse, s'imbibe lentement du tampon déposé dans la cuve. Les tampons utilisés ont été: (a) tampon acétate: 0,051 M acide acétique, 0,049 M acétate de sodium (conductivité = 0,00206), (b) tampon véronal, pH 8,5; 0,05 M.

Le dépôt de la prise est fait par capillarité sur une ligne tracée au crayon qui constitue la ligne de départ. On promène simplement la pipette à pointe rodée avec un mouvement de va-et-vient régulier sur une longueur de 2 cm. Les pistes correspondant aux différentes prises sont espacées d'environ 1 cm.

c) Coloration des diagrammes: Trois types de coloration ont été essayés:

1- à la ninhydrine: le papier séché est trempé dans une solution acétonique de ninhydrine (250 mg/1000 cm³), puis séché à nouveau. La coloration est longue à apparaître, elle est stable un ou deux jours puis se modifie.

2- au bleu de bromophénol alcoolique: le papier séché est trempé pendant 20 minutes dans une solution alcoolique de bleu de bromophénol (1 g/1000 cm³), saturée de Cl₂Hg. Il est lavé à l'eau courante pendant

30 minutes, puis séché.

3- au bleu de bromophénol aqueux: la bande mouillée est trempée pendant 16 heures dans une solution de ce colorant, puis lavée pendant 15 minutes dans trois bains successifs d'acide acétique à 10 %, puis fixée par un séjour de 15 minutes dans un bain dont la composition est la suivante: acide acétique 100 g, acétate de sodium 50 g, eau distillée q.s.p. 1000 cm³.

d) Analyse photométrique des bandes colorées: Les bandes colorées au bleu de bromophénol aqueux ont été analysées au photomètre enregistreur. Les lignes de base ont été tracées sur les clichés en prenant comme zéro le point le plus bas du diagramme enregistré. Les surfaces comprises entre les pointes des diagrammes et la ligne de base sont planimétrées sur chacun d'eux et permettent de suivre de manière quantitative la protéolyse.

1.712 Résultats, colorations.

Les trois colorations permettent de révéler la lactoglobuline native. Les produits d'hydrolyse apparaissent particulièrement bien à la ninhydrine, mais presque toutes les bandes détectées à la ninhydrine le sont également, quoiqu'avec beaucoup moins de sensibilité, au bleu de bromophénol alcoolique. Cette coloration est beaucoup moins intense en milieu borate.

Avec le bleu de bromophénol aqueux, le nombre des bandes révélées se réduit à deux: les autres passent en solution et doivent correspondre à des produits de poids moléculaire plus faible. La bande correspondant à la lactoglobuline native est beaucoup plus intense qu'avec les deux autres méthodes.

Au point de vue quantitatif, nous craignons que des erreurs importantes s'introduisent avec la coloration à la ninhydrine. La protéine, en effet, est beaucoup moins sensible à la coloration que les acides aminés; des traces d'acides aminés, se trouvant sur le papier au même endroit que la protéine, pourraient changer considérablement la coloration apparente de cette dernière. C'est pourquoi, pour l'analyse qualitative des diagrammes et la recherche des produits intermédiaires, nous

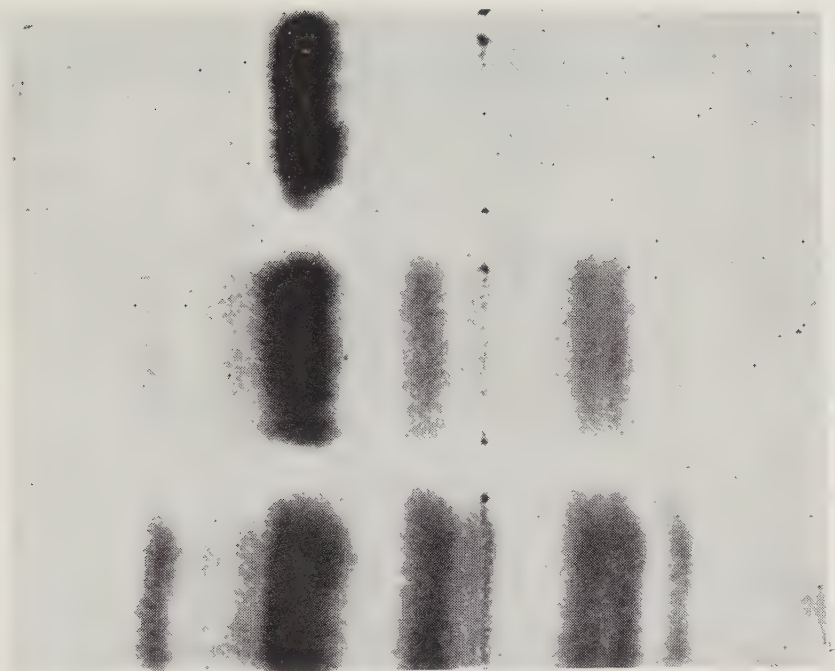


Figure 10.

Analyse d'hydrolysats par électrophorèse sur papier à pH 8,5.

Electrophorèse en tampon véronal pH 8,5 (durée: 3 heures, intensité: 7,8 mA; Champ: 8 volts/cm). Bandes colorées à la ninhydrine.

Hydrolyse de la lactoglobuline native (24 mg/cm³, NaCl 0,1 N, 35°C, pH 8,0) par la trypsine ($e = 250 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$), arrêtée aux temps $t = 4 \text{ mn}$ (9 LP/mol. titrées, au milieu), et $t = 15 \text{ mn}$ (19 LP/mol. titrées, en bas) par addition d'inhibiteur (STI = 1 mg/cm³). En haut, témoin sans trypsine.

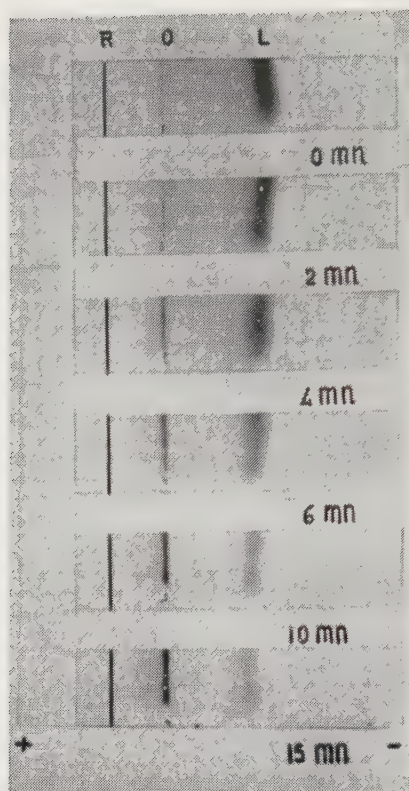


Figure 11.

Analyse d'hydrolysats par électrophorèse sur papier à pH 4,5.

(Durée: 15 heures; intensité 8,2 mA; champ 8 volts/cm).
Bandes colorées au bleu de bromophénol aqueux.

Hydrolyse de la lactoglobuline native (23 mg/cm³, NaCl 0,1 N, 35°C, pH 8,0) par la trypsine (e = 250 γ/cm³) suivie en même temps par titrage des liaisons peptidiques détruites:

- O : ligne de départ, tache correspondant aux produits d'hydrolyse insolubles dans les conditions de coloration.
- R : repère tracé au crayon parallèle à la ligne de départ.
- L : tache correspondant à la lactoglobuline non hydrolysée.

avons choisi la coloration à la ninhydrine. Pour l'analyse quantitative de la bande "lactoglobuline native" avec des degrés variables d'hydrolyse, nous avons coloré au bleu de bromophénol aqueux.

Observation qualitative des diagrammes.

Les diagrammes d'électrophorèse sur papier de lactoglobuline native et d'hydrolysats correspondant à des degrés variables de protéolyse compris entre 0 et 80 %, montrent que tout au long de la protéolyse, un composant dont la concentration décroît constamment, a la même mobilité que la lactoglobuline native, aussi bien à pH 8,5 qu'à pH 4,5.

La figure 10 montre l'un de ces bandes, obtenue après électrophorèse à pH 8,5 d'hydrolysats (0, 37 %, 80 %) et colorée à la ninhydrine. Les taches révélées sont au nombre de 7; le nombre des produits formés au cours de cette protéolyse est donc faible. Leur concentration semble augmenter régulièrement; on n'observe pas de croissance suivie d'une décroissance, qui permette d'affirmer qu'il se forme des produits intermédiaires. Toutefois le faible nombre des déterminations ainsi que leur aspect qualitatif ne permet pas de tirer des conclusions sur cette formation éventuelle.

Des diagrammes colorés au bleu de bromophénol aqueux sont présentés sur la figure 11. On distingue seulement deux bandes, l'une correspond à la lactoglobuline non dégradée, l'autre aux produits de dégradation qui ne sont pas passés en solution au cours de la coloration. Ceux-ci ont une mobilité pratiquement nulle à ce pH (4,5). Leur concentration augmente constamment. Sur la figure 12 (cf. page 46) sont tracés des relevés photométriques d'une série de ces diagrammes correspondant à des durées de 0, 2, 4, 6, 10 et 15 minutes de protéolyse à pH 8,0, $c = 250 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$.

Analyse quantitative des diagrammes.

D'après les résultats du paragraphe précédent et ceux de l'étude des hydrolysats par ultracentrifugation analytique (cf. II, § 1.8), on trouve constamment au cours de la protéolyse de la lactoglobuline par la trypsine à pH 8,0, en NaCl 0,1 N, un composant dont la concentration décroît constamment et qui a les mêmes propriétés que la lactoglobuline

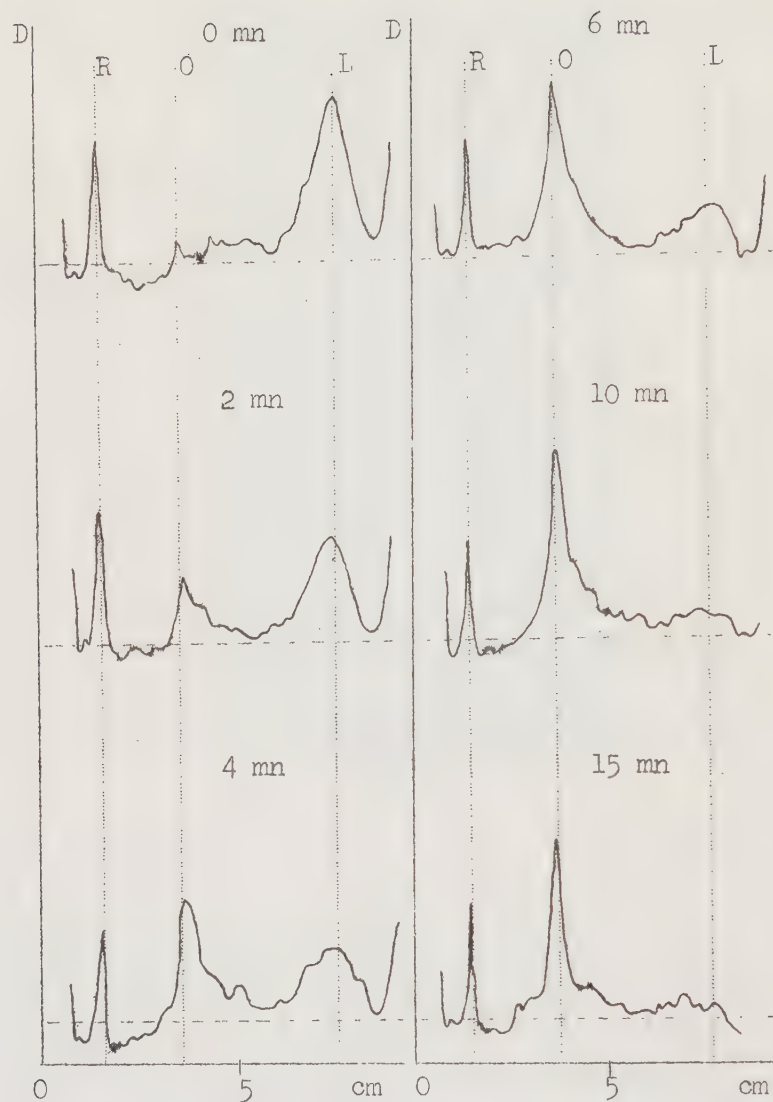


Figure 12.

Relevé photométrique des bandes d'électrophorèse correspondant à des degrés variables d'hydrolyse.

Lactoglobuline native, NaCl 0,1 N, trypsine: $e = 250 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$, 35°C , pH 8,0. Electrophorèse en tampon acétate pH 4,5 (bandes colorées: figure 11).

Degré d'hydrolyse mesuré par la méthode potentiométrique continue

en LP/Mole : 0 mn : 0 ; 2 mn : 5,4 ; 4 mn : 8,8.

6 mn : 11,7 ; 10 mn : 15,6 ; 15 mn : 18,4.

R : repère au crayon tracé sur la bande parallèlement à la ligne de départ.

O : ligne de départ et pointe correspondant aux produits de réaction.

L : pointe de la lactoglobuline native non attaquée.

native au point de vue mobilité à pH 8,5 et 4,5 et vitesse de sédimentation. Il est donc justifié d'admettre que ce composant est la lactoglobuline native.

On admet que la concentration de lactoglobuline non hydrolysée est proportionnelle à la surface comprise entre la pointe correspondante du relevé photométrique et la ligne de base, donc à la quantité de colorant fixé. Cette hypothèse n'est correcte que lorsque la protéine correspondant à cette bande n'est pas du tout modifiée par rapport à la protéine native.

En portant en ordonnées le rapport des surfaces A_t/A_0 , A_t étant la surface mesurée sur le diagramme correspondant à la durée "t" de protéolyse, et A_0 celle correspondant au temps $t = 0$, et en abscisses le rap-

port du nombre de liaisons peptidiques détruites au temps t, à la concentration en lactoglobuline exprimée en molécule-gramme (PM = 38.000), on obtient la courbe

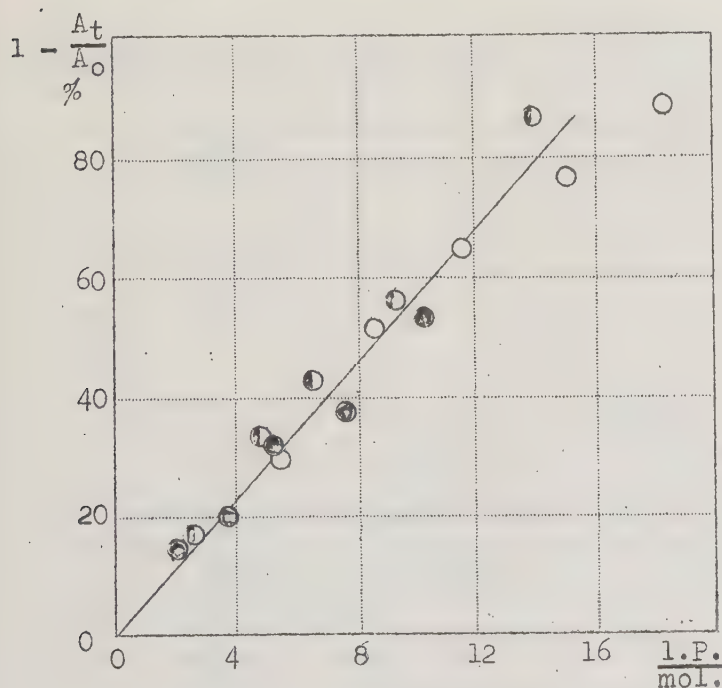


Figure 13.

Comparaison du nombre de liaisons peptidiques détruites mesurées par la méthode continue avec la mesure des concentrations de la lactoglobuline native non digérée à partir des bandes d'électrophorèse.

En abscisses: nombre de liaisons peptidiques détruites divisé par la concentration initiale en lactoglobuline exprimée en mole (PM=38.000).

En ordonnées: rapport des surfaces A_t/A_0 .

A_t surface comprise entre la pointe et la ligne de base; relative à la pointe lactoglobuline sur le diagramme correspondant à la durée "t" de protéolyse.

A_0 idem sur le diagramme correspondant à la lactoglobuline non protéolysée ($t = 0$).

tracée sur la figure 13 (cf. page 47) représentant les résultats de trois expériences distinctes.

On voit que cette courbe est absolument linéaire, jusqu'à des pourcentages de protéolyse voisins de 80 %. La pente de cette droite correspond à 20 liaisons peptidiques détruites par molécule de lactoglobuline hydrolysée. Il est plus faible que le chiffre admis pour l'hydrolyse complète de la lactoglobuline; il est probable que l'un ou plusieurs des produits formés se dégradent très lentement par rapport à l'hydrolyse de la protéine jusqu'à ce que plus d'une trentaine de liaisons peptidiques soient finalement coupées.

1.72 Ultracentrifugation analytique.

L'étude des hydrolysats par ultracentrifugation analytique a été faite de façon parallèle à l'étude par électrophorèse sur papier.

Nous avons mesuré la vitesse de sédimentation du composant lourd dans des hydrolysats correspondant à des degrés variables de protéolyse (compris entre 0 et 50 %).

Technique: La protéolyse d'une solution de lactoglobuline native, 25 mg/cm³, par la trypsine ($\sigma = 130 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$), en milieu NaCl 0,1 N, pH 8,0 et 35°C, est suivie par la méthode continue (cf. II, § 1.3). Avant l'addition de trypsine (temps zéro) et aux temps 2, 4, 6, 10 et 15 minutes, 0,470 cm³ de l'hydrolysat sont prélevés et mélangés immédiatement avec 0,155 cm³ d'inhibiteur de la graine de soja (1,65 mg/cm³) et 0,6 cm³ de NaCl 0,1 N. Ces solutions sont gardées à 2°C jusqu'à leur étude par ultracentrifugation. Celles-ci se sont échelonnées au rythme de trois par jour pendant deux jours. Les temps compris entre la protéolyse et la centrifugation sont indiqués sur le tableau des résultats. On peut voir qu'il ne semble pas y avoir eu de modification de la protéine hydrolysée pendant cette attente.

Résultats: Les diagrammes (figure 14) présentent une pointe qui descend avec la même vitesse de sédimentation (tableau I) quel que soit le degré d'hydrolyse. Il n'y a donc pas de modification progressive dans le poids moléculaire de la fraction lourde au cours de la protéolyse.

Les fragments sont beaucoup plus légers, nous n'avons observé aucun décollement du ménisque après 100 minutes de centrifugation à 59.780 tours par minute ($\gamma = 250.000 \text{ g}$). Cette pointe semble correspondre à un composant homogène (voir le relevé des diagrammes, figure 14).

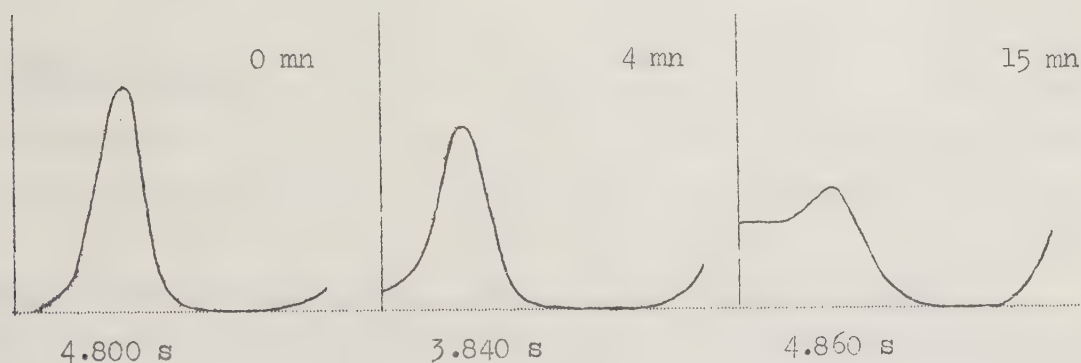


Figure 14. Diagrammes d'ultracentrifugation d'hydrolysats de lactoglobuline par la trypsine.

Hydrolyse: Lactoglobuline 24 mg/cm³, trypsine $c = 132 \text{ g/cm}^3$, pH 8,0, NaCl 0,1 N, 35°C; réaction arrêtée par addition de STI; durée d'hydrolyse: 0, 4, 15 minutes.

Ultracentrifugation: Concentration en protéine: 10 mg/cm³. Photographies prises aux temps indiqués, barre 45°, 59.780 tours minute.

TABEAU I

Degré d'hydrolyse LP/mol	Durée de protéolyse minutes	Attente avant U-centrifugation heures	Vitesse de sédimentation Svedberg
0	0	24	2,60
2,2	2	3	2,46
4,5	4	48	2,58
6,1	6	0,5	2,46
12,8	15	30	2,47

Les valeurs de S sont un peu faibles par rapport à celles généralement trouvées qui sont de l'ordre de 2,80 Svedbergs pour une concentration en protéine de 10 mg/cm³ dans NaCl 0,1 N [14].

1.8 Conclusions.

Dans nos conditions expérimentales, la mesure des vitesses de protéolyse par détermination des produits solubles dans l'acide trichloracétique, ne nous permet pas d'avoir des résultats interprétables. En effet, la quantité de produits en solution correspondant à un certain degré de protéolyse est fortement influencée par la concentration du précipité dans le mélange précipitant. On ne peut donc pas comparer les vitesses de réaction obtenues avec des concentrations variables en substrat protéique.

Par contre, l'analyse des hydrolysats par électrophorèse sur papier et par ultra-centrifugation, et la comparaison des résultats avec ceux obtenus par titrage des liaisons peptidiques détruites, ont montré que pendant la plus grande partie de la protéolyse de la lactoglobuline par la trypsine à pH 8,0, à 35°C. en milieu NaCl 0,1 N:

- la vitesse d'attaque de la protéine est proportionnelle aux vitesses mesurées par titrage des liaisons peptidiques détruites. Le coefficient de proportionnalité permet de calculer le nombre de liaisons peptidiques détruites par molécule de lactoglobuline hydrolysée; ce nombre est 20;

- il ne semble pas y avoir de produits intermédiaires détectables par ces méthodes.

D'après ce que nous avons vu (cf.II, § 1.1), nous pouvons donc utiliser la méthode de titrage des liaisons peptidiques détruites pour mesurer les vitesses de protéolyse et en déduire des constantes de Michaelis ou des énergies d'activation qui correspondent à l'attaque de la lactoglobuline par la trypsine.

Parmi ces méthodes, nous en avons utilisé deux. Nous montrons que la plus précise et la plus rapide est une méthode potentiométrique continue par laquelle on titre les groupes H_2 apparaissant lors de la coupure de la liaison $..CO-NH..$; ce titrage n'est quantitatif, à priori, que pour un pH expérimental supérieur au pK du groupe α -ammonium d'au moins une unité de pH. Or, cette méthode, à pH 8,0, donne quantitativement les mêmes résultats que la méthode de titrage des groupes CO_2^- en milieu acétonique. Il est donc probable que les groupes α -ammonium appa-

rus ont des pK inférieurs à 7. Il est connu que le pK des groupes α -ammonium est d'autant plus faible que le polypeptide a un poids moléculaire élevé: pour les protéines ces pK sont compris entre 6 et 8 d'après Klotz [35], entre 7,6 et 8,4 d'après Cohn et Edsall [17].

2. PREPARATIONS.

2.1 Trypsine.

Nous avons utilisé des échantillons de trypsine (Worthington 50 % SO_4 Mg, une fois cristallisée) gardée en dessiccateur à 0°C depuis leur réception (environ une année). Des solutions 10 mg/cm³ en protéine sont dialysées contre HCl M/100 ou M/1000 avec plusieurs changements, puis conservées à 0°C. Elles perdent un peu d'activité pendant cette période.

Les concentrations sont mesurées sur des solutions d'environ 0,5 mg/cm³ par lecture de la densité optique au spectrophotomètre Beckman; nous avons vérifié que le coefficient à 280 m μ $1/\epsilon = \text{mg/cm}^3 / D_{1 \text{ cm}}$ ne varie pas dans la zone de pH 3-8; nous l'avons pris égal à 0,62 (détermination faite à 3 % près par microdosage d'azote Kjeldahl au laboratoire par P.Joliot). Remarquons qu'on a donné pour ce coefficient des valeurs très différentes qui s'échelonnent depuis 0,56 (Kunitz [52]) jusqu'à 0,73 (Uber et McLaren [65]).

Lorsque nous étudions les cinétiques par la méthode potentiométrique continue, les dilutions à partir de la solution de trypsine ont toujours été faites de manière à avoir une concentration finale 10^{-3} N de HCl. Ainsi les solutions de trypsine pouvaient être gardées quelques heures à la température de la pièce sans perdre d'activité.

Les quantités de trypsine ajoutées pour 8 à 16 cm³ de lactoglobuline varient suivant le type d'expériences et la concentration finale en trypsine (e), que nous voulions obtenir, entre 0,155 cm³ et 0,846 cm³.

Pour la méthode de Linderström-Lang, comme il est nécessaire de ne pas acidifier le milieu en ajoutant la trypsine, celle-ci était diluée à partir de la solution mère par addition d'eau bidistillée.

2.2. β -Lactoglobuline native.

2.21 Préparation.

Nous l'avons préparée selon une modification apportée par Cecil et Ogston [14] à la méthode de Palmer [53]. Le rendement était d'environ 25 g pour 18 litres de lait écrémé. Nous n'avons généralement pas fait de deuxième recristallisation; celle-ci en effet ne change pas la composition du produit final observé par électrophorèse [70]. La suspension cristalline est gardée en glacière à 0°C après addition d'une goutte de toluène, elle est utilisée dans les deux mois qui suivent sa préparation.

Les solutions sont faites par dissolution des cristaux décantés dans le milieu salin; elles sont toujours étudiées moins de 48 heures après leur préparation, gardées en glacière et amenées à la température de la pièce quelques heures avant leur utilisation. En milieu tampon borate pH 8, le pH est ajusté par addition lente soit de NaOH 0,1 N, soit par dialyse contre ce tampon pendant une nuit, à la glacière, à travers cellophane, avec agitation. On n'observe pas de différences dans les vitesses de protéolyse des solutions préparées par l'une ou l'autre de ces méthodes. Les solutions sont utilisées dans la journée.

2.22 Electrophorèse.

Nous avons été amenée au cours de la préparation de la lactoglobuline dénaturée à étudier le comportement de nos solutions à l'électrophorèse: nous en avons profité pour comparer nos résultats avec ceux publiés par d'autres auteurs. On sait que la β -lactoglobuline se présente sous une forme homogène à pH 4,3 [54] et à pH 7,0 en tampon phosphate [9], à pH 6,5 en tampon acétate et phosphate [45], alors qu'à pH 4,8 en tampon acétate [38,45] une nette hétérogénéité indique la présence de deux à quatre composants.

Les électrophorèses ont été faites à 3°C, dans un appareil du type Tiselius, avec un gradient de potentiel de 4,3 volts/cm *. Les diagrammes sont obtenus par le dispositif Philpot-Svensson.

* au Service d'Electrophorèse du C.N.R.S. par M. de Mende.

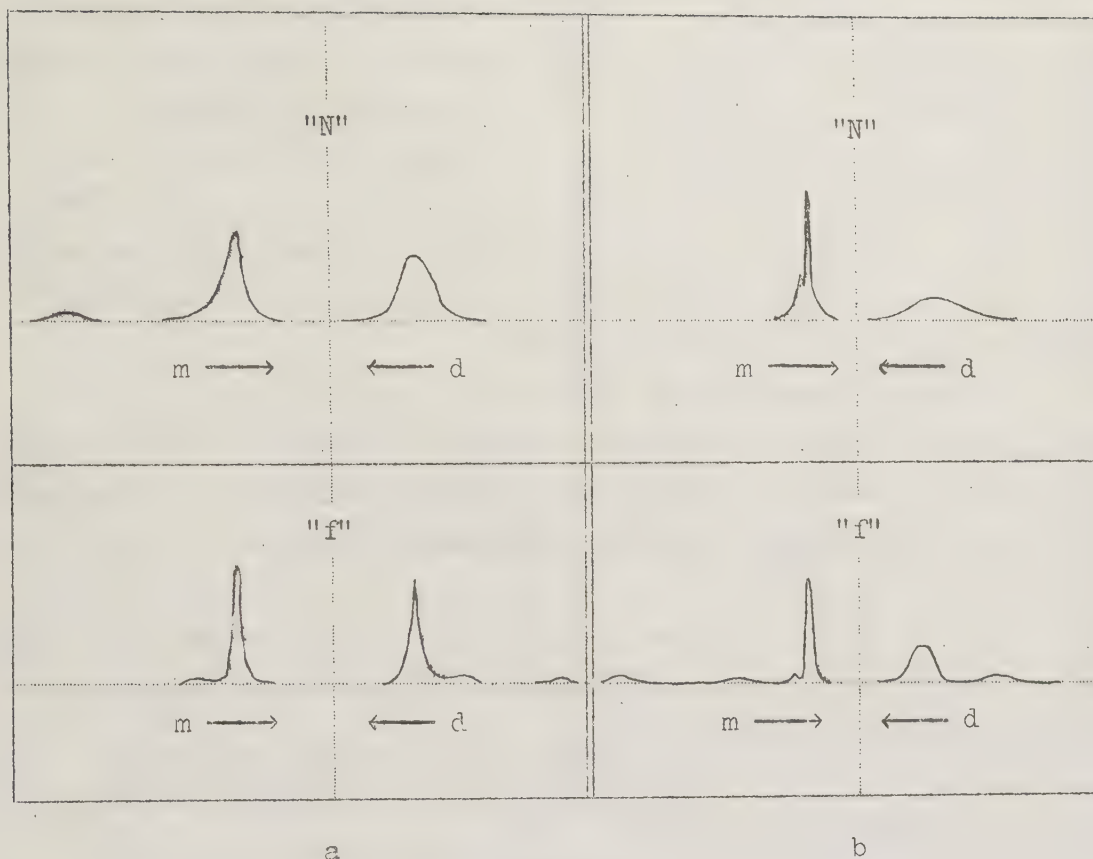


Figure 15.

Diagrammes d'électrophorèse de lactoglobuline native "N" et de lactoglobuline dénaturée par la chaleur "f", en tampon phosphate et borate.

a : tampon phosphate, pH 6,9, $\mu = 0,1$, $0,025 \text{ M KH}_2\text{IO}_4 \rightarrow 0,025 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$.

b : tampon borate, pH 7,1, M/5, selon Palitsch.

conductivité: 0,003 m pour les deux tampons..

Champ : 8 volts.cm⁻¹

Température : 3°C.

Mobilités Native phosphate: $6,1 \text{ cm}^2.\text{volt}^{-1}.\text{sec}^{-1}.10^5$

Native borate (1): 6,3

(2): 6,6 (branches montantes).

Les lettres m et d indiquent les branches respectivement montantes et descendantes.

A pH 6,9, en tampon phosphate, le diagramme (figure 15a, page 53) montre une seule pointe dont la forme correspond bien à une courbe de Gauss; les diagrammes montants et descendants sont symétriques. La mobilité, exprimée en $\text{volt}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot 10^5$: 6,1 en tampon phosphate pH 7 (conductivité $\xi = 0,0034$) ne diffère pas de façon significative de celle donnée par Briggs et Hull [9]: 6,3 en phosphate $\mu = 0,1$. Une différence de 0,1 pH ou de 30 % dans la concentration des tampons phosphate suffit à expliquer cet écart. Briggs et Hull ne donnent pas la composition exacte de leur tampon ni sa conductivité.

A pH 6,9, en tampon borate (figure 15b, page 53), il y a sur la partie montante deux pointes d'importances très inégales et de mobilités peu différentes des précédentes; les diagrammes montants et descendants sont très dissymétriques: ceci est généralement interprété comme l'indication d'une forte interaction entre le solvant et la protéine. Nous avons vu par ailleurs une autre preuve de cette interaction dans la protection exercée par le borate vis-à-vis de la protéolyse trypsique de la lactoglobuline (cf. III, § 1.62).

2.23 Electrophorèse sur papier.

La photométrie des bandes obtenues par électrophorèse sur papier en tampon borate d'une solution de lactoglobuline à 28 mg/cm³, a donné un résultat comparable à celui obtenu à l'appareil de Tiselius, puisqu'on y distingue aussi deux composants (figure 16).

2.3 Lactoglobuline dénaturée par la chaleur.

De très nombreuses techniques ont été employées pour dénaturer la lactoglobuline par la chaleur: la température, le milieu, le pH, la concentration en protéine et la durée de chauffage variant de l'une à l'autre; chaque technique donnant probablement un produit de propriétés différentes.

Nous avons choisi les méthodes décrites par Briggs et Hull [9]. Ces auteurs ont montré qu'en dénaturant par la chaleur la β -lactoglobuline en tampon phosphate, on obtenait un mélange de deux composants de

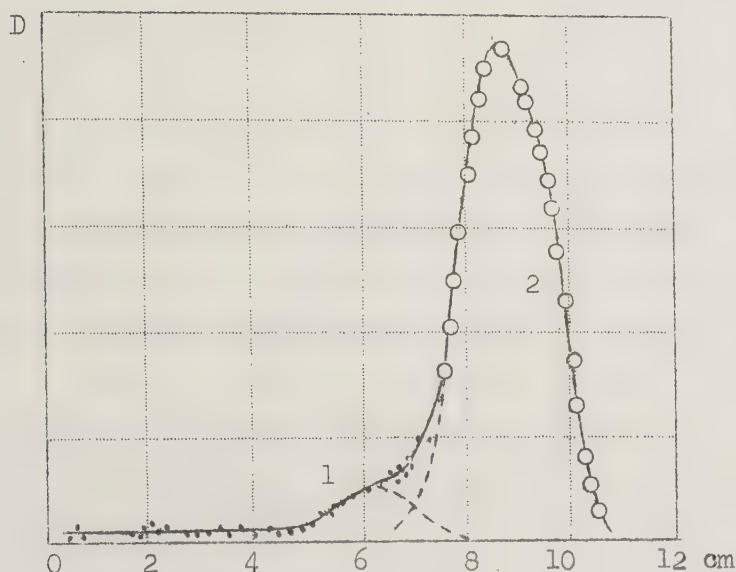


Figure 16.

Relevé photométrique d'une bande d'électrophorèse sur papier avec coloration au bleu de bromophénol.

Champ: 4 volts/cm, intensité: 2,5 mA. Durée: 16 heures.
Lactoglobuline native 28 mg/cm³ en tampon borate pH 7,0;
conductivité 0,003.

15 mm³ déposés sur la bande.

En abscisses : longueur depuis la ligne de départ.

En ordonnées : densités optiques.

En pointillé : reconstitution des courbes de Gauss correspondant à chacun des composants.

mobilités électrophorétiques différentes. La valeur de ces mobilités ne change pas avec la durée et la température; seule la proportion relative des deux composants varie. Dans certaines conditions expérimentales, il est possible de préparer soit l'un, soit l'autre de ces composants avec une homogénéité satisfaisante.

2.31 Préparation du composant lent "s".

D'après ces auteurs, le composant lent "s" qui a la même mobilité que la forme native, résulte du premier stade de la dénaturation. Il est transformé en "f", composant rapide, selon une réaction du deuxième ordre dont la constante de vitesse k est très sensible à certains facteurs: température, force ionique, pH; ainsi, à pH 6,9 (force ionique 0,1), k est maximum à 80°C et nulle à 100°C; k_{300} (pH 6,9) passe de 40 pour une force ionique de 0,1, à 250 pour une force ionique de 0,2; de 57 à pH 6,6 à 1 à pH 8,0 (force ionique 0,1).

Nous avons constaté qu'il était difficile de modifier quoi que ce soit à la technique décrite par Briggs et Hull. C'est pourquoi nous opérons ainsi: la solution 5 mg/cm³ en lactoglobuline, dialysée contre un tampon phosphate (pH 6,9, force ionique 0,1) est soigneusement dégazée. Pour cela on la place quelques heures dans un dessiccateur contenant de l'eau (pour éviter que la solution ne se concentre) et dans lequel on a fait le vide à la pompe à palette jusqu'à commencement d'ébullition. On ferme alors le robinet du dessiccateur et on laisse la solution sous vide pendant quelques heures. 20 cm³ de cette solution dégazée sont versés dans un ballon à paroi mince et à long col (capacité 200 cm³ environ) que l'on plonge dans un bain d'eau bouillante en remuant pour que la température s'équilibre rapidement; un entonnoir renversé couvre l'extrémité du col. Après 10 minutes, le contenu est versé dans un erlenmeyer plongé dans un mélange eau-glace et brutalement refroidi.

Le reste de la solution dégazée est ainsi dénaturée par fraction de 20 cm³ de manière que ces solutions restent le moins longtemps possible aux températures intermédiaires, favorables à la transformation de "s" en "f".

Appelons A la technique que nous venons de décrire et B la modification suivante: le chauffage se fait sans dégazage préalable et en ampoule scellée à la température de la pièce et pression atmosphérique.

Le tableau suivant montre l'influence de cette modification et celle de la concentration en lactoglobuline lors du chauffage sur le pourcentage des composants "s" et "f".

Concentration lactoglobuline	mode de chauffage	tampon	conductivité	% "s"	% "f"
5 mg/cm ³	B	phosphate	0,006	60	40
5 mg/cm ³	A	phosphate	0,006	80	20
5 mg/cm ³	A	phosphate	0,003	97	3
20 mg/cm ³	A	phosphate	0,003	60	40
20 mg/cm ³	A	borate	0,003	21	78

On voit sur ce tableau que par chauffage en ampoule scellée, le rendement en "s" diminue notablement. La transformation du composé lent en composé rapide est donc liée, elle aussi, à un phénomène d'oxydation. Christensen avait déjà suggéré que l'oxygène dissous jouait un rôle important dans la transformation de la lactoglobuline dénaturée réversiblement par l'urée en dénaturée irréversiblement. On sait d'autre part [37, 33] que les groupes sulfhydriles de la lactoglobuline dénaturée par la chaleur sont autoxydables par l'oxygène atmosphérique, même à basse température. Cette action de l'oxygène dissous dans la réaction "s" $\xrightarrow{k}$ "f" expliquerait la diminution de la vitesse k lorsque la température augmente entre 80 et 100°C. Cette oxydation se fait avec polymérisation puisque le poids moléculaire du composé rapide est d'environ 830.000 d'après Briggs et Hull.

Les solutions de "s" sont absolument limpides; leur coefficient d'extinction spécifique est égal à celui des solutions de lactoglobuline native. Généralement, nous avons mesuré les concentrations par microdosage d'azote Kjeldahl ($N = 15,6\%$) [15].

Après la dénaturation en tampon phosphate, 15 cm³ sont prélevés pour faire les contrôles d'homogénéité à l'électrophorèse, le reste est dialysé une nuit à travers cellophane, à 2°C, contre un grand volume de NaCl 0,1 N, avec agitation; la protéine dénaturée reste en solution, le pH ne descend pas en dessous de 6,9. Les solutions sont gardées en glacière et utilisées dans la journée; elles sont amenées à la température de la pièce une heure avant leur utilisation; à la température de l'ex-

périence, puis à pH 8,0 environ 10 minutes avant l'addition de trypsine.

Lors de l'électrophorèse sur papier, le composant lent "s" migre avec une vitesse égale à celle de la lactoglobuline native.

2.32 Préparation du composé rapide "f".

Il est très facile d'obtenir le composant "f" à l'état électrophorétiquement pur. Généralement, après dialyse de la lactoglobuline contre le tampon phosphate pH 6,9 nous la chauffons à la concentration de 5 ou 10 mg/cm³ en ampoule scellée, nous la portons 4 heures à 60°. Les solutions sont moins limpides que celles de la lactoglobuline dénaturée "s", leurs concentrations sont mesurées par microdosage d'azote kjeldahl (N = 15,6 %). Une partie aliquote est prélevée pour le contrôle d'homogénéité à l'électrophorèse, le reste est dialysé contre NaCl 0,1 N de la même manière que la solution "s".

Il n'est pas possible de les étudier par électrophorèse sur papier car la protéine reste adsorbée sur la ligne de départ.

* * *

IIIe PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE DE LA PROTEOLYSE
DE LA LACTOGLOBULINE NATIVE ET DENATUREE PAR LA CHALEUR.

Nous décrivons dans cette partie les résultats concernant la protéolyse par la trypsine, à différentes températures et dans plusieurs milieux salins, des trois substrats: lactoglobuline native et lactoglobulines dénaturées par la chaleur "s" et "f".

1. LACTOGLOBULINE NATIVE.

1.1 Remarque sur la mesure du pH des solutions.

Le pH d'une solution de lactoglobuline en milieu NaCl 0,1 N, aux environs de pH 8,0, varie beaucoup avec la température, probablement à cause du fort coefficient de température de dissociation des groupes ammonium.

Par exemple, le pH d'une solution amenée à pH 8,0 à 20°C, devient égal à 7,5 lorsque la solution est portée à 45°C (les potentiels d'asymétrie étant réglés chaque fois avec un tampon phosphate pH 7,0 amené à la même température que la solution à mesurer). Comme le tampon phosphate a un coefficient de température négligeable, la variation du pH mesuré est bien relative à la solution de lactoglobuline.

Tous les pH indiqués pour les solutions de lactoglobuline sont donc mesurés à la température à laquelle on étudie la protéolyse.

1.2 Stabilité des solutions.

Nous avons constaté que les vitesses de protéolyse de trois échan-

tillons d'une solution en NaCl 0,1 N amenée à pH 8,0 à 35°, et maintenue à cette température pendant des temps variables: 10 minutes, 60 minutes et 4 heures 30, étaient remarquablement constantes (1,51, 1,51, 1,51 10^{-7} LP/min/cm³) (méthode potentiométrique continue).

Généralement, les pH étaient ajustés 10 minutes avant le début de la protéolyse.

1.3 Influence de la force ionique.

Dans les limites étudiées, nous n'avons pas noté de variations de vitesse de protéolyse avec la force ionique.

Une solution de lactoglobuline 7 mg/cm³ à pH 8,0 et 35°C, s'hydrolyse avec la même vitesse pour des concentrations 0,1 N et 0,05 N en NaCl.

1.4 Variation des vitesses de protéolyse avec la concentration en trypsine.

Nous avons étudié les courbes de protéolyse de la lactoglobuline native à 35°C pour des concentrations en trypsine qui varient entre 4 et 150 γ /cm³. Un même volume (0,773 cm³) de solutions de trypsine en HCl 10^{-3} N préparées par dilutions quantitatives à partir d'une même solution mère est ajouté à 8 cm³ d'une solution de lactoglobuline 6 mg/cm³ en NaCl 0,1 N. La protéolyse est suivie par la méthode potentiométrique continue.

Les mesures de vitesse ont été faites de telle façon qu'il ne peut s'introduire d'erreur due à une inactivation plus ou moins grande des solutions de trypsine entre leur préparation (faites simultanément) et leur utilisation. La figure 17 montre l'évolution des réactions en fonction du temps. La précision sur la vitesse initiale est de l'ordre de 1 %.

Si l'on porte les variations de cette vitesse initiale en fonction de la concentration en trypsine, comme nous l'avons fait sur la figure 18 (page 62), on voit que les vitesses ne sont proportionnelles aux concentrations en trypsine que pour les très faibles valeurs de ces concen-

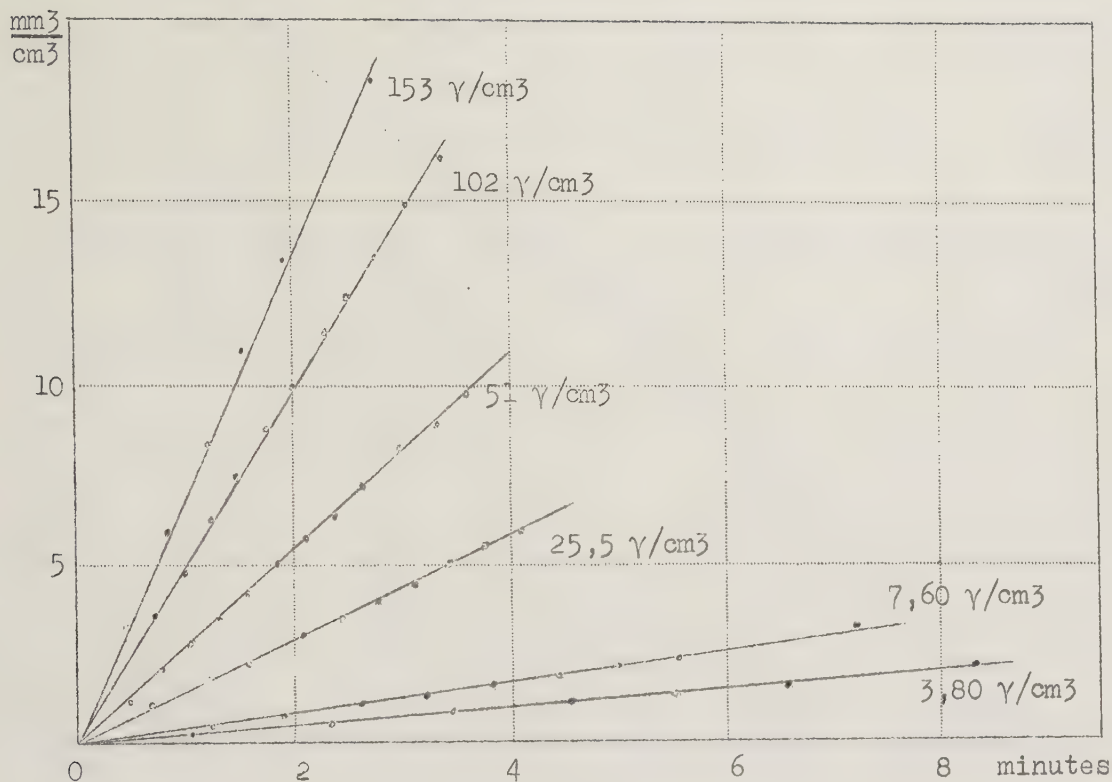


Figure 17. Cinétiques de protéolyse de la lactoglobuline suivie par la méthode potentiométrique continue pour différentes concentrations en trypsine.

En abscisses: temps écoulé depuis l'addition de trypsine.

En ordonnées: nombre de mm³ de NaOH 0,1 N ajoutés à 1 cm³ d'hydrolysate pour maintenir le pH constant (1 mm³ correspond à 10⁻⁷ liaisons peptidiques détruites).

Lactoglobuline native 6 mg/cm³, NaCl 0,1 N, pH 8,0, 35°C.

trations. Pour $e = 100 \gamma/\text{cm}^3$, l'écart de la courbe $v = f(e)$ avec la tangente à l'origine est déjà de 10 %.

Des expériences moins précises (voir III, § 1.5) semblent indiquer qu'à 20°C l'écart est encore plus grand.

Nous avons voulu voir si cette courbe est conforme à la relation générale déduite de la théorie des réactions enzymatiques. Nous avons vu (cf. I, § 1.31) que cette relation est de la forme:

$$p K_m = (e - p)(s - p) \quad \text{avec} \quad p = v/k_2.$$

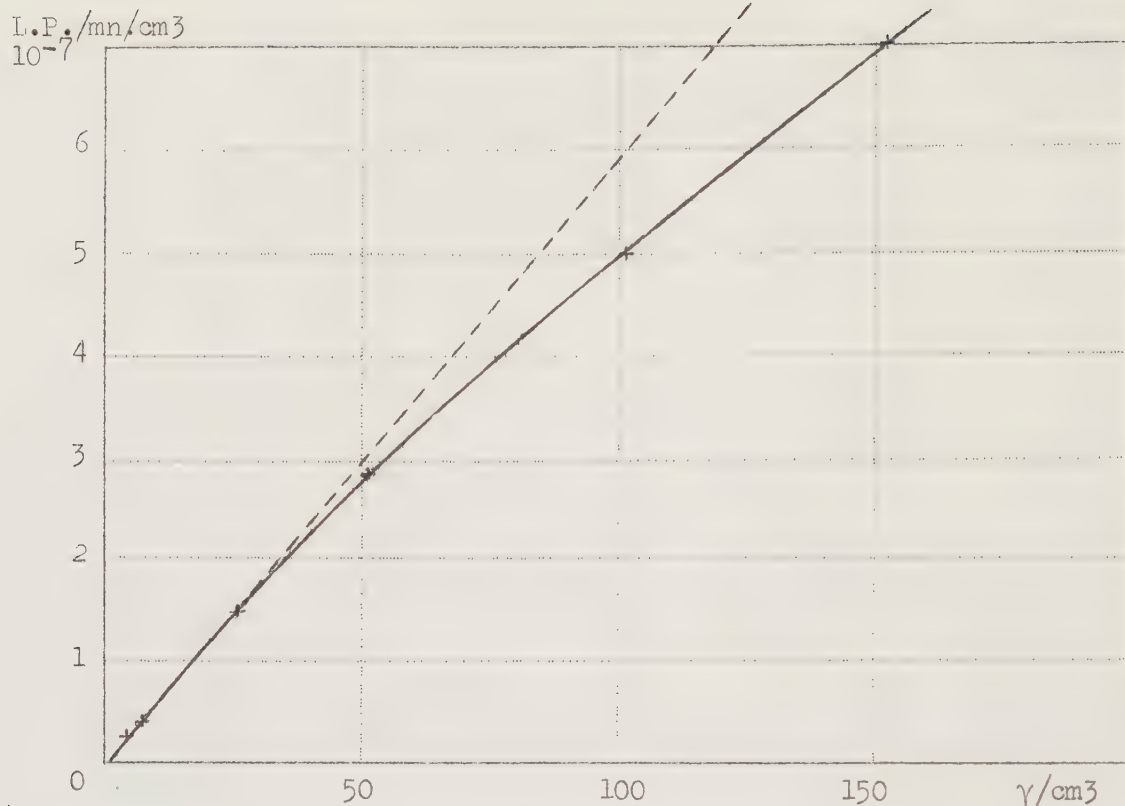


Figure 18. Variation des vitesses avec les concentrations en trypsine.

En abscisses: concentrations en trypsine exprimées en γ/cm^3 .

En ordonnées: Vitesses de protéolyse exprimées en liaisons peptidiques détruites. $\text{min}^{-1}.\text{cm}^3^{-1}.10^7$.

Lactoglobuline native 6 mg/cm^3 , NaCl 0,1 N, pH 8,0, 35°C.

En pointillé, la tangente à l'origine.

$$\text{Donc} \quad e = K_m \cdot \frac{v/k_2 s}{1 - v/k_2 s} + v/k_2$$

A partir de cette relation, on peut calculer facilement l'application numérique avec les valeurs suivantes:

$$K_m = 0,83.10^{-4}$$

$$s = 1,66.10^{-4}$$

$$k_2 = \frac{v}{e} = 7,2.10^{-6} \text{ LP}/\text{min}.\text{cm}^3 \text{ pour } 1 \gamma/\text{cm}^3 \text{ de trypsine à pH 8,0, } 35^\circ\text{C.}$$

$$= 0,15 \text{ LP}/\text{min}.\text{cm}^3 \text{ par conc.mol. de trypsine.}$$

en prenant 24.000 comme poids moléculaire de la trypsine [18]. Le ta-

bleau suivant donne les différents intermédiaires du calcul. Nous avons pris une série de valeurs arbitraires du rapport v/k_2s à partir desquelles nous avons calculé v/k_2 d'une part et e d'autre part; dans la dernière colonne nous portons l'écart relatif entre la courbe $v = f(e)$ et la tangente à l'origine.

v/k_2s	$v/k_2 \cdot 10^4$	$\frac{v/k_2s}{1-v/k_2s}$	$\frac{Km v/k_2s}{1-v/k_2s}$	e $M \cdot 10^4$	e mg/cm ³	écart relatif
0,5	0,83	1	0,836	1,660	4,000	33 %
0,25	0,415	1/5	0,276	0,691	1,650	10 %
0,10	0,166	1/9	0,092	0,258	0,595	
0,05	0,083	5/95	0,0436	0,127	0,302	1 %
0,01	0,0166	1/99	0,00838	0,250	0,060	
0,005	0,0083	5/995	0,00417	0,0125	0,030	
0,001	0,00166	1/999	0,0003830	0,0025	0,006	
0,0005	0,00083	5/9995	0,000416	0,00125	0,003	

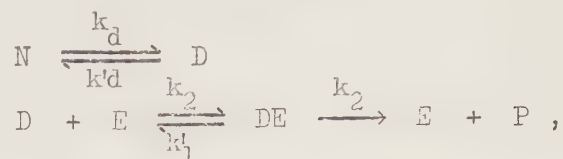
Dans cette courbe théorique, l'écart entre la courbe et la tangente à l'origine n'atteint 10 % que pour des concentrations en trypsine de 1,6 mg/cm³; l'écart entre les résultats théoriques et expérimentaux est donc considérable.

Pour expliquer le fait que la lactoglobuline est saturée en trypsine beaucoup plus tôt que ne le laisse prévoir l'union d'une molécule de substrat à une molécule d'enzyme, il faudrait admettre:

- soit qu'il y a une trentaine de groupes actifs par molécule de trypsine: cette hypothèse n'est pas en accord avec les rares déterminations du nombre de groupes actifs par molécule; Loewus et Briggs [43] ont trouvé pour la chymotrypsine un seul groupe actif par molécule. Balls et Jansen [3], étudiant la fixation du diisopropyl-fluorophosphate (DFP) sur la trypsine, trouvent un groupe actif par molécule;

- soit que la concentration en substrat réel est beaucoup plus petite que la concentration mesurée. Si, par exemple, on admettait l'hypo-

thèse de Linderström-Lang, avec le schéma:



la concentration en substrat réel D peut être très petite devant la concentration mesurée de substrat, soit N.

Si cette hypothèse est correcte, elle permettrait d'évaluer d'après les relations établies précédemment (cf. I, par. 2.21), la valeur de l'expression $(1 + k_2/k_d)$, soit, ici, $1,6/0,05 = 30$ (rapport des valeurs théoriques et expérimentales de e, donnant la même déviation de $v = f(e)$ par rapport à la linéarité.

1.5 Variation des vitesses avec la température: énergie d'activation.

Des solutions de lactoglobuline native (environ 5 mg/cm³) en NaCl 0,1 N sont amenées à la température désirée, puis, après 5 à 10 minutes, à pH 8,0 par addition de NaOH 0,1 N.

Les concentrations de trypsine sont faibles (environ 30 γ/cm³) et sont identiques quelle que soit la température; les vitesses sont alors proportionnelles aux concentrations en trypsine.

Les vitesses sont mesurées par la méthode potentiométrique continue. La figure 19 montre les cinétiques de protéolyse à 21°, 28° et 35°C; chacune de ces déterminations a été faite deux ou trois fois. Le tableau II (cf. page 65) donne les résultats de plusieurs de ces expériences en NaCl 0,1 N (exp. 10 à 13) et borate M/20. (exp. 16). Les résultats sont dans l'ensemble bien reproductibles, si l'on met à part ceux de l'expérience 12, faite avec une solution de lactoglobuline gardée 3 jours en NaCl 0,1 N au point isoélectrique à 4°; ils montrent que l'énergie d'activation déterminée comme nous l'indiquons précédemment (cf. I, § 1.22), est la même dans ces deux milieux et a une valeur moyenne de 18.600 cal./mol.

Comme les constantes de Michaelis ne varient pas avec la température (cf. III, § 1.51), cette énergie d'activation se confond avec celle de la réaction de décomposition du complexe intermédiaire.

La comparaison des expériences 10 et 11 montre que les vitesses ne

TABLEAU II

Lactoglobuline native.
Energies d'activation, pH 8,0.

Exp.	$t^{\circ}C$	v/e $10^{-9} \cdot LP \cdot min^{-1} \cdot cm^3^{-1}$ par γ/cm^3 trypsine	$1/T \times 10^3$ (degrés K) $^{-1}$	$\log_{10} v/e$	μ calories/mole
10	20°0	0,96	3,41	1,98	19.000
	25°9	1,60	3,34	0,21	
	30°4	2,64	3,29	0,42	
	34°1	4,22	3,26	0,62	
11	20°4	0,67	3,41	1,83	
	25°9	1,30	3,34	0,11	
12	20°7	0,79	3,40	1,93	16.500
	20°8	0,79	3,40	1,93	
	24°4	1,41	3,36	0,15	
	29°9	2,24	3,30	0,35	
	34°9	2,70	3,25	0,43	
	35°0	2,80	3,25	0,45	
13	20°8	1,04	3,40	0,016	18.500
	20°8	1,05	3,40	0,020	
	27°8	2,20	3,32	0,34	
	27°8	2,22	3,32	0,36	
	34°8	4,12	3,25	0,61	
	34°8	4,31	3,25	0,63	
	34°8	4,31	3,25	0,63	
14	19°2	1,0	3,42	0,0	19.600
	29°2	2,94	3,31	0,47	
	39°9	9,2	3,195	0,96	
15	16°7	0,65	3,45	1,81	18.000
	22°1	1,46	3,39	0,16	
	32°0	3,28	3,28	0,52	
	37°6	5,8	3,22	0,76	
16	16°7	0,65	3,45	1,81	18.000
	22°1	1,08	3,39	0,03	
	32°0	3,14	3,23	0,50	
	37°6	5,0	3,22	0,70	

Exp. 10 :	s_o	=	5,5 mg/cm 3	e	=	30 γ/cm^3	NaCl 0,1 N
11 :	s_o	=	5,5 mg/cm 3	e	=	100 γ/cm^3	NaCl 0,1 N
12 :	s_o	=	5,5 mg/cm 3	e	=	30 γ/cm^3	NaCl 0,1 N
13 :	s_o	=	5,0 mg/cm 3	e	=	40 γ/cm^3	NaCl 0,1 N
14 :	s_o	=	6,3 mg/cm 3	e	=	40 γ/cm^3	Borate M/20
15 :	s_o	=	5,3 mg/cm 3	e	=	160 γ/cm^3	Borate M/20
16 :	s_o	=	5,3 mg/cm 3	e	=	160 γ/cm^3	NaCl 0,1 N

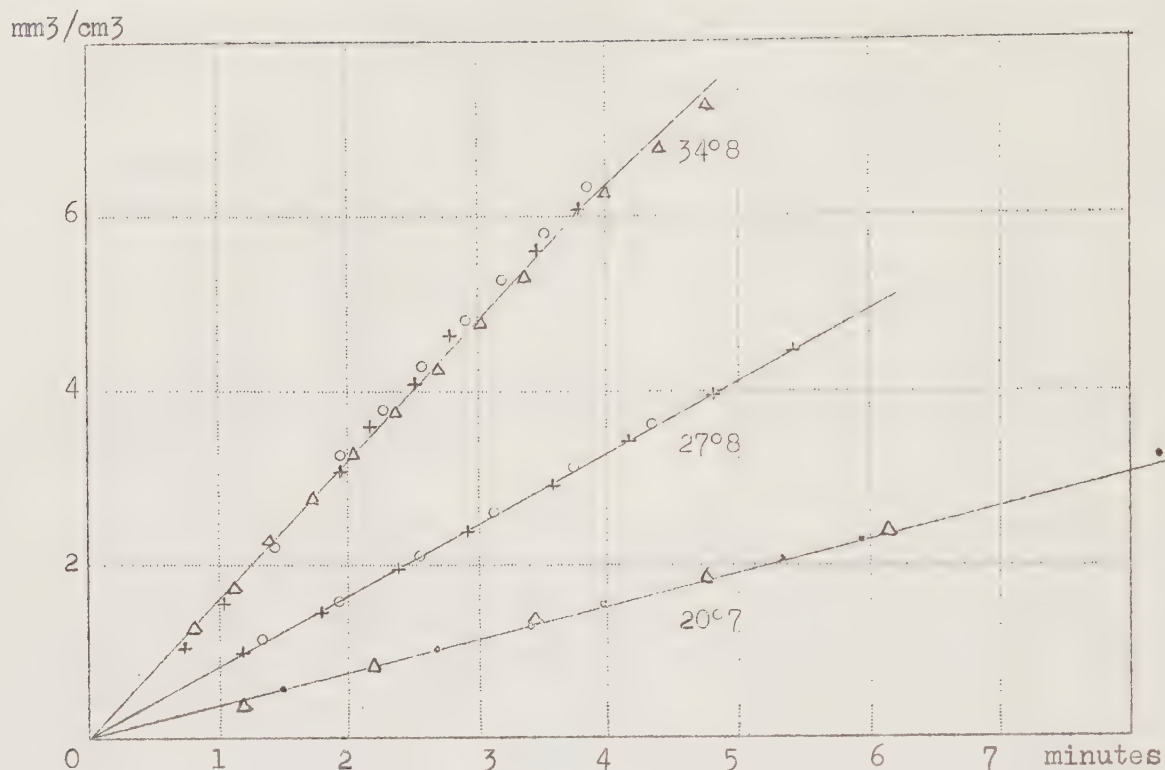


Figure 19.

Cinétique de protéolyse de la lactoglobuline native à plusieurs températures.

En abscisses: temps écoulé depuis l'addition de trypsine.

En ordonnées: nombre de mm³ de soude 0,1 N ajoutés par cm³ de solution pour maintenir le pH constant (1 mm³ égal à 10⁻⁷ LP).

sont plus proportionnelles aux concentrations de trypsine lorsque celles-ci atteignent environ 100 γ/cm³ à 20°.

1.6 Variation des vitesses avec les concentrations en substrat.

Lorsque les concentrations en lactoglobuline varient de 1 à 30 mg/cm³, les vitesses de réaction augmentent. En portant les résultats selon la représentation $v = f(v/s)$ (cf. I, § 1.13), on peut déterminer la

TABLEAU III

Lactoglobuline native: pH 8,0; 45°C; NaCl 0,1 N.

Variation des vitesses initiales de protéolyse avec les concentrations en substrat.

Exp.	s mg/cm ³	v/e 10 ⁻⁹ .LP.min ⁻¹ .cm ³ ⁻¹ par γ/cm ³ trypsine	v/es 10 ⁻⁹ .LP.min ⁻¹ .mg ⁻¹ par γ/cm ³ trypsine	Km mg/cm ³	V/e 10 ⁻⁹ .LP.min ⁻¹ .cm ³ ⁻¹ par γ/cm ³ trypsine
22	0,88 0,85 17,5	3,7 3,7 13,7	4,15 4,25 0,78	3	17
23	0,85 0,85 17,5	4,0 4,3 16,1	4,7 5,0 0,92	3	19
24	14,7 7,65 3,9 1,56 0,71 0,71	15,5 13 9,5 5,45 3,0 3,0	1,05 1,7 2,46 3,5 4,15 4,15	4	20
25	18,7 18,7 9,5 5,0 2,05 0,93 0,93	13,6 13,6 11,5 9,9 6,3 3,8 3,8	0,72 0,72 1,18 2,0 3,1 4,15 4,15	3	16

$$e = 15 \gamma/\text{cm}^3$$

constante de Michaelis par la pente de la droite obtenue (si les concentrations en trypsine sont faibles), et les vitesses maxima, proportionnelles aux constantes de vitesse de décomposition du complexe intermédiaire, par les ordonnées à l'origine.

Nous avons fait ces déterminations à pH 8,0:

- en milieu NaCl 0,1 N par la méthode potentiométrique continue, à 21°,

35° et 45°C;

- en milieu borate M/20 et en NaCl 0,1 N à 22° et 35°C, au cours d'expériences comparatives entre la méthode par précipitation trichloracétique et une adaptation de la méthode continue (cf.II, § 1.52);
- en milieu borate M/20 et M/10, comparativement, par la méthode de titrage en milieu acétonique, à 35°C.

1.61 Variation des constantes de Michaelis avec la température.

1.611 Résultats expérimentaux.

La figure 20 (cf.page 69) montre les résultats expérimentaux (tableaux III, IV et V, cf.p.70) selon la représentation $v = f(v/s)$.

TABEAU IV

Lactoglobuline native; pH 8,0; 35°C; NaCl 0,1 N.
Variation des vitesses initiales de protéolyse avec les concentrations en substrat.

Exp.	s mg/cm ³	v/e 10 ⁻⁹ .LP.min ⁻¹ .cm ³ ⁻¹ par γ/cm ³ trypsine	v/es 10 ⁻⁹ .LP.min ⁻¹ .mg ⁻¹ par γ/cm ³ trypsine	Km mg/cm ³	V/e 10 ⁻⁹ .LP.min ⁻¹ .cm ³ ⁻¹ par γ/cm ³ trypsine
30	10,0 7,35 4,75 2,40 1,25 1,25 1,25	5,9 5,35 4,55 3,4 2,4 2,4 2,4	0,59 0,73 0,96 1,42 1,90 1,90 1,90	3	7,4
31-a	1,9	2,9	1,50	3	7,2
b	1,9	3,1	1,61		
c	1,9	3,0	1,61		
a	9,1	5,55	0,61		
b	9,1	5,75	0,63		
c	8,9	5,75	0,64		

c = 30 γ/cm³

- Exp. 31: a : solution amenée à pH 8,0, 35°C, 5 minutes avant l'addition de trypsine.
 b : solution amenée à pH 8,0, 35°C, 3 heures avant l'addition de trypsine.
 c : solution en milieu NaCl 0,1 N, tampon phosphate M/100.

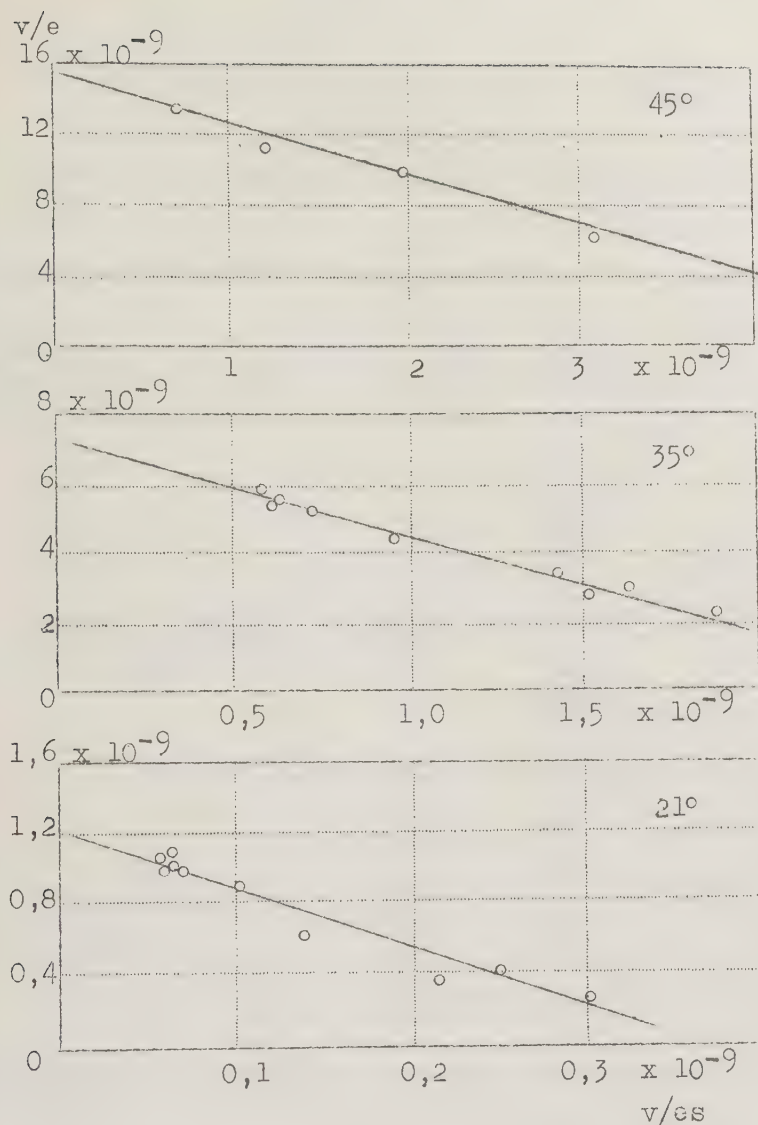


Figure 20.

Détermination des constantes de Michaelis à différentes températures, pour la protéolyse de la lactoglobuline native par la trypsine.

En abscisses $v/e.s$
(LP.min⁻¹.mg⁻¹ par
γ/cm³ trypsine)

En ordonnées v/e
(LP.min⁻¹.cm³⁻¹ par
γ/cm³ trypsine)

La pente mesure K_m en
mg/cm³

NaCl 0,1 N, méthode potentiométrique continue.

Concentrations en trypsine:

à 44°C, $e = 15 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$

à 35°C, $e = 30 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$

à 21°C, $e = 170 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$

On voit que, dans la limite des erreurs expérimentales (inférieures à 10 %), la constante de Michaelis est identique à 35° et à 45°C. Sa valeur est 3 mg/cm³, soit $0,8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ calculée sur la base d'un poids moléculaire de 38.000 en admettant une combinaison molécule à molécule; nous discuterons cette hypothèse (cf. III, § 3.1). La valeur déterminée à 21°C est légèrement supérieure et voisine de 4 mg/cm³; mais comme nous avons travaillé avec des concentrations de 170 γ/cm³ de trypsine, nous nous

TABLEAU V

Lactoglobuline native; pH 8,0; 20°C; NaCl 0,1 N.

Variations des vitesses initiales de protéolyse avec les concentrations en substrat.

Exp.	s mg/cm ³	v/e	v/es	Km mg/cm ³	V/e
		10 ⁻¹⁰ .LP.min ⁻¹ .cm ³ ⁻¹ par γ/cm ³ trypsine	10 ⁻¹⁰ .LP.min ⁻¹ .mg ⁻¹ par γ/cm ³ trypsine		10 ⁻¹⁰ .LP.min ⁻¹ .cm ³ ⁻¹ par γ/cm ³ trypsine
35	17,5	11,5	0,65	4	13
	9,05	9,1	1,0		
	4,6	6,4	1,38		
	1,86	4,0	2,15		
	1,86	4,5	2,45		
	0,95	2,7	2,95		
36	17,0	10,4	0,60	4,5	12
	17,0	10,9	0,64		
	8,8	6,6	0,75		
	4,5	5,7	1,28		
	1,94	3,8	1,95		
	1,94	3,8	1,95		
	1,94	3,8	1,95		
37	17,5	10,0	0,57	5	12,5
	9,9	9,2	0,76		
	4,0	6,5	1,3		
	1,03	2,1	2,1		

$$e = 160 \gamma / \text{cm}^3$$

trouvions placé dans une zone où les vitesses ne sont pas proportionnelles aux concentrations d'enzyme. Comme nous l'avons vu (cf.I, § 1.32), il est donc possible que les valeurs trouvées soient un peu trop fortes.

Quoi qu'il en soit la différence n'est pas grande et l'on peut admettre en première approximation que la constante de Michaelis ne varie pas avec la température.

Nous verrons par ailleurs (cf.III, § 2.2) que les constantes de Michaelis correspondant aux deux formes "s" et "f" de lactoglobuline dénaturée par la chaleur, ne varient pas non plus avec la température.

1.612 Equivalence de Km avec la constante de dissociation du complexe trypsine-lactoglobuline.

Nous venons de voir que, pour les différents substrats étudiés, la constante de Michaelis est pratiquement indépendante de la température. Or, nous avons vu que la constante de Michaelis est égale à $(k_1' + k_2)/k_1$. Les résultats groupés dans le tableau VI montrent que dans le même intervalle de température (20° à 45°), k_2 varie d'un facteur supérieur à 10 tandis que Km est constant. Comme il est peu probable que les variations de k_1' compensent presque exactement celles de k_2 , il est beaucoup plus vraisemblable que k_2 est négligeable par rapport à k_1' et que la constante de Michaelis s'identifie à la constante de dissociation du complexe trypsine-lactoglobuline. L'hypothèse d'Henri est donc vérifiée dans ce cas particulier.

TABEAU VI

t° C	21°	35°	45°
$v/e / \left[\frac{LP \cdot min^{-1} \cdot cm^3^{-1}}{\gamma / cm^3 \text{ trypsine}} \right]$	$1,6 \cdot 10^{-9}$	$7,3 \cdot 10^{-9}$	$18,0 \cdot 10^{-9}$
$k_2 * \left[\frac{M \cdot min^{-1}}{mg/cm^3 N \text{ trypsine}} \right]$	$5,4 \cdot 10^{-4}$	$24 \cdot 10^{-4}$	$59 \cdot 10^{-4}$
Km mg/cm ³	4 ± 1	$3 \pm 0,3$	$3 \pm 0,3$
Km $\frac{M/1}{10^4}$	$1,0 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$

* Nous avons montré (cf. II, § 1.9) que $20 LP \sim 1 M$.

1.613 Energétique de la formation du complexe trypsine-lactoglobuline.

Aux valeurs de $K_m = K$, constante de dissociation de l'équilibre $E + S \rightleftharpoons ES$, correspondent, d'après la relation $\Delta F = RT \ln K$, les valeurs suivantes pour la lactoglobuline native.

$$\Delta F_{35^\circ} = -5.800 \text{ cal/mol}$$

$$\Delta H = 0$$

$$\Delta S = +18 \text{ cal/degé/mol.}$$

Cette valeur de ΔF est calculée en admettant que le complexe trypsine-lactoglobuline se fait molécule à molécule. Comme cette hypothèse est peu plausible pour les formes dénaturées polymérisées "s" et "f" pour lesquelles plusieurs groupes peptidiques par molécule sont certainement capables de se combiner à la trypsine, nous n'avons pas calculé pour ces formes les valeurs de ΔF (voir III, § 3.11).

1.62 Influence du borate sur la vitesse maxima et la constante de Michaelis.

Yon [71], à pH 7,0, par la méthode trichloracétique, a comparé pour diverses concentrations en substrat les vitesses de protéolyse de la lactoglobuline par la trypsine en milieu borate (acide borique M/5, NaCl M/10, borate M/200) et en tampon phosphate 0,1 M. Elle a trouvé à 35° des résultats identiques dans les deux milieux, mais à 25°, la vitesse était plus faible en milieu borate. Comme la constante de Michaelis n'était pas modifiée, l'inhibition était donc du type non compétitif. Cette augmentation de l'inhibition, lorsque diminue la température, est confirmée du reste par un autre travail du même auteur [69] qui trouve une énergie d'activation de 28.000 cal/mol. en tampon borate au même pH, au lieu de 19.000 en tampon phosphate.

D'autre part, les résultats trouvés par la méthode continue de titrage des liaisons peptidiques détruites en milieu NaCl 0,1 N et borate (acide borique M/20, NaCl M/20, amené à pH 8,0 par addition de NaOH N) (figure 21), montre qu'à 22° les vitesses sont identiques dans ces deux milieux. A 35°C, les vitesses semblent légèrement supérieures en tampon borate.

Enfin, les valeurs trouvées pour les constantes de Michaelis, en tampon borate M/20, valeurs voisines de 3 mg/cm³, ne correspondent pas avec des déterminations antérieures ($K_m = 9$ mg/cm³) faites en collaboration avec J.Yon [36], dans un milieu borate plus concentré (acide borique M/5, NaCl M/20, NaOH N jusqu'à pH 8,0).

Nous avons donc fait quelques expériences supplémentaires pour essayer de lier ces différents résultats.

Les protéolyses ont été étudiées à pH 8,0, 35°, pour plusieurs

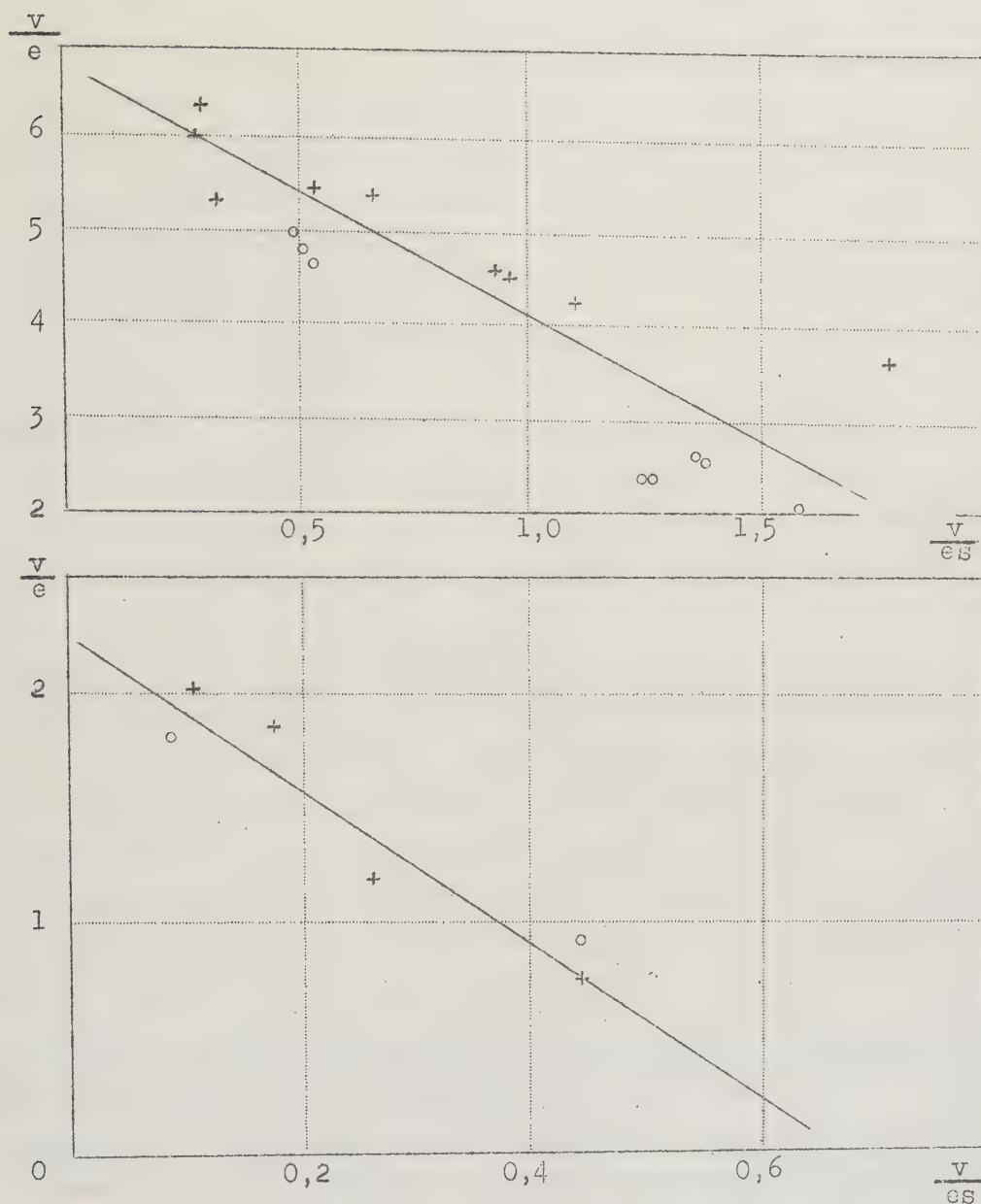


Figure 21.

Détermination des constantes de Michaelis à différentes températures en milieu borate M/20 et NaCl 0,1 N.

En abscisses : v/es ($10^{-9} \cdot \text{LP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ par γ/cm^3 de trypsine).

En ordonnées : v/e ($10^{-9} \cdot \text{LP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^3^{-1}$ par γ/cm^3 de trypsine).

Mesures approximatives par la méthode potentiométrique continue (voir texte).

+ : borate M/20

o : NaCl 0,1 N.

Lactoglobuline native, trypsine 17 γ/cm^3 à 35°C, 45 γ/cm^3 à 22°C.

concentrations en lactoglobuline native.

- Soit en acide borique M/20, NaCl M/20, amené à pH 8,0 par NaOH N.
- Soit en acide borique M/10, NaCl M/10, amené à pH 8,0 par NaOH N.

Toutes les solutions de lactoglobuline ont été soigneusement ajustées au même pH, mesuré à 35°. Comme le milieu est fort tamponné, nous avons dû utiliser la méthode de Linderström-Lang pour mesurer les vitesses. Nous avons fait de nombreuses déterminations pour palier au manque de précision.

La figure 22 montre l'influence du borate sur les vitesses maxima et sur les constantes de Michaelis à 35°. En borate M/20, la vitesse est plus grande qu'en NaCl M/10. Donc le borate active légèrement la vitesse de protéolyse; il diminue légèrement la constante de Michaelis ($K_m \sim 2 \text{ mg/cm}^3$).

Lorsque la concentration du tampon borate devient M/10, la réaction est fortement inhibée; la constante de Michaelis est alors d'environ 3 mg/cm³. La différence des constantes de Michaelis en borate M/10 et en borate M/20 n'est pas nettement supérieure aux erreurs expérimentales.

Cette inhibition est due probablement à une action du borate sur la lactoglobuline et non sur la trypsine, d'une manière analogue à l'action des cations ammonium et calcium [71] sur le même système lactoglobuline-trypsine à pH 7,0. La protéolyse de la caséine est inhibée à 35° également. Bersin et Berger [5] ont montré que le borate inhibe la protéolyse de l'édénine par la pepsine en se fixant sur le substrat. Quoique nous n'ayons pas encore fait d'expériences directes pour vérifier cette hypothèse, elle est suggérée par l'anomalie trouvée à l'électrophorèse en tampon borate à pH 7,0. Nous avons vu (cf. II, § 2.2) que les diagrammes montants et descendants de la lactoglobuline en tampon borate sont très dissymétriques, et que le diagramme montant présente deux pointes au lieu d'une seule en tampon phosphate au même pH. Ces deux faits semblent indiquer une modification réversible de la protéine sous l'influence du solvant. On ignore tout à fait sur quels groupes est susceptible de se fixer le borate dans une protéine.

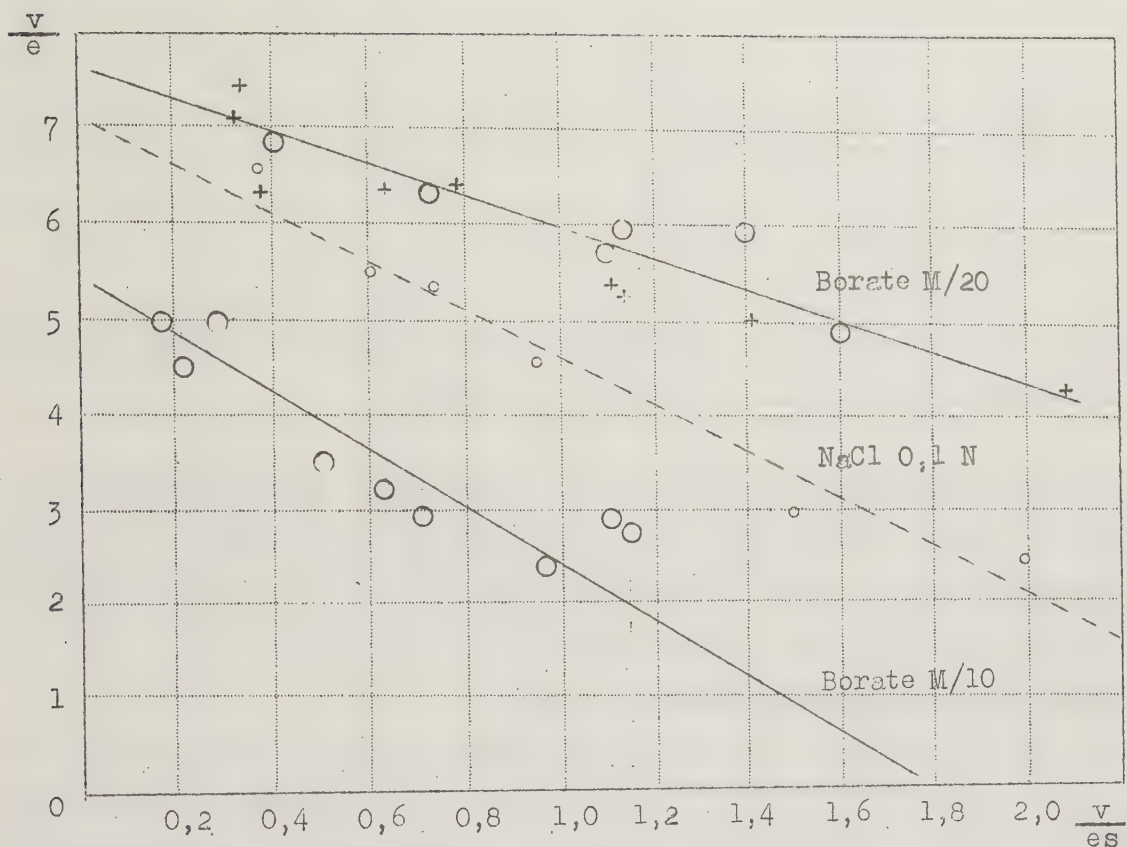


Figure 22.

Influence du borate à différentes concentrations sur la vitesse de protéolyse et la constante de Michaelis.

En abscisses : $v/e.s$ ($10^{-9}.LP.min^{-1}.mg^{-1}$ par γ/cm^3 de trypsine).
 En ordonnées : v/e ($10^{-9}.LP.min^{-1}.cm^3^{-1}$ par γ/cm^3 de trypsine).
 Protéolyse de la lactoglobuline native, pH 8,0, 35°C, $e = 20 \gamma/cm^3$
 en NaCl 0,1 N : ○ vitesses mesurées par la méthode continue.
 en borate M/20 : + vitesses mesurées par la méthode continue.
 ○ vitesses mesurées par la méthode de Linderström-Lang.
 en borate M/10 : ○ vitesses mesurées par la méthode de Linderström-Lang.

2. LACTOGLOBULINE DENATUREE PAR LA CHALEUR: FORMES "s" ET "f".

Nous vous décrivons la préparation et les propriétés de ces deux formes de lactoglobuline (cf. II, § 2.22). L'homogénéité électrophorétique des solutions "s" à pH 7,0 varie selon les expériences entre 80 et 95 %. Toutes les expériences sauf une (exp. 18) ont donné des résultats concernant les vitesses de protéolyse reproductibles d'une fois à l'autre.

L'homogénéité électrophorétique des solutions "f", à pH 7,0, est toujours voisine de 90 %. Les résultats des mesures de vitesse de protéolyse sont reproductibles d'une fois à l'autre.

2.1 Variation de la vitesse avec la température: énergie d'activation.

Les solutions de lactoglobuline dénaturée "s" ou "f" ont des concentrations de 5 mg/cm³ environ; les concentrations en trypsine sont de 10 γ/cm³ pour la forme "s" et d'environ 40 γ/cm³ pour la forme "f", quelle que soit la température étudiée.

Les résultats de ces expériences sont donnés dans les tableaux VII et VIII. La valeur moyenne de l'énergie d'activation est la même pour les deux formes; elle est égale à 14.200 cal./mol. ($\pm$ 500). De même que pour la lactoglobuline native, cette énergie d'activation est celle de la réaction de décomposition du complexe intermédiaire puisque, comme nous le verrons par la suite, la constante de Michaelis ne varie pas avec la température (cf. III, § 2.2).

2.2 Variation des vitesses avec les concentrations en substrat: constantes de Michaelis.

Dans l'ensemble, nous n'avons pu faire varier les concentrations en lactoglobuline dénaturée que dans une faible proportion, entre 0,8 et 5 mg/cm³; en effet, nous avons vu les difficultés rencontrées pour préparer les solutions de lactoglobuline "s" à l'état homogène (cf. II, § 2.22) lorsqu'elles sont plus concentrées.

Les constantes de Michaelis ainsi déterminées sur une faible échelle

TABLEAU VII

Lactoglobuline dénaturée "s". Energie d'activation.

Exp.	t°C	v/e $10^{-9} \cdot \text{LP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^3^{-1}$ par γ/cm^3 trypsine	$1/T$ (degrés K) $^{-1}$	$\log_{10} v/e$	μ cal./mol.
17 a	20°2	3,12	3,41	0,49	13.800
b	20°2	3,08	3,41	0,49	
b	28°5	6,15	3,32	0,71	
b	35°9	10,15	3,23	1,01	
b	44°9	19,7	3,14	1,29	
18	17°8	1,63	3,45	0,21	14.700
	23°1	2,60	3,38	0,41	
	28°9	4,4	3,31	0,64	
	34°8	7,1	3,25	0,85	
	42°5	12,4	3,17	1,09	

NaCl 0,1 N : exp. 17 : s = 5,0 mg/cm³ a : e = 20 γ/cm^3
 b : e = 10 γ/cm^3
 exp. 18 : s = 4,75 mg/cm³ e = 17 γ/cm^3

TABLEAU VIII

Lactoglobuline dénaturée "f": énergie d'activation.

Exp.	t°C	v/e $10^{-9} \cdot \text{LP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^3^{-1}$ par γ/cm^3 trypsine	$1/T$ (degrés K) $^{-1}$	$\log_{10} v/e$	μ cal./mol.
19	20°3	1,60	3,40	0,20	14.200
	25°7	2,36	3,34	0,37	
	30°3	3,38	3,30	0,53	
	34°9	4,90	3,24	0,69	
20	15°8	1,1	3,46	0,04	14.200
	20°6	1,53	3,41	0,18	
	25°6	2,2	3,35	0,34	
21	25°6	2,53	3,35	0,40	
	30°7	3,9	3,30	0,59	
	35°9	5,4	3,24	0,73	

Exp. 19 : s = 4,5 mg/cm³; e = 12 γ/cm^3
 Exp. 20 : s = 4,5 mg/cm³; e = 39 γ/cm^3
 Exp. 21 : s = 4,5 mg/cm³; e = 12 γ/cm^3

de concentrations sont donc peu précises, surtout quand ces concentrations n'encadrent pas la valeur de la constante en question.

Les tableaux IX et X donnent les résultats des expériences faites: ils montrent que la constante de Michaelis est identique, aux erreurs expérimentales près,

- quelle que soit la température, dans les milieux étudiés,
- que la lactoglobuline dénaturée soit la forme "s" ou "f", lorsque ces constantes sont exprimées en mg/cm^3 * .

La valeur moyenne est environ $0,9 \text{ mg/cm}^3$; nous admettrons une erreur relative d'environ 20 % pour cette détermination.

TABEAU IX

Lactoglobuline dénaturée "s": variation des vitesses de protéolyse avec les concentrations en substrat.

Exp.	t°	s mg/cm ³	v/e 10 ⁻⁹ .LP.min ⁻¹ . cm ³ ⁻¹ par γ/cm^3 trypsine	v/es 10 ⁻⁹ .LP.min ⁻¹ . mg ⁻¹ par γ/cm^3 trypsine	Km mg/cm ³	V/e 10 ⁻⁹ .LP.min ⁻¹ . cm ³ ⁻¹ par γ/cm^3 trypsine
40	44°C	4,55	15,8	3,5	0,70	19
		2,74	15,1	5,5		
		0,91	10,7	11,7		
		0,47	7,7	16,3		
		0,47	7,0	14,9		
41	44°C	4,5	16,2	3,5	0,90	19,6
		2,7	15,1	5,6		
		1,80	12,9	7,1		
		0,90	9,3	10,5		
		0,42	6,15	14,6		
		0,42	6,5	13,4		
42	35°C	0,42	6,6	15,8	0,85	9,5
		4,20	8,3	2,0		
		3,36	9,3	2,7		
		2,52	8,6	3,4		
		1,70	7,1	4,1		
		0,84	5,3	6,4		

e = $7 \gamma/\text{cm}^3$ (Exp. 40 et 41)

e = $5,5 \gamma/\text{cm}^3$ (Exp. 42)

* Nous discuterons la façon d'exprimer les constantes de Michaelis pour les réactions de protéolyse (cf. III, § 3.1).

TABLEAU X

Lactoglobuline dénaturée "f":
variation des vitesses initiales de protéolyse avec les concentrations en substrat.

Exp.	t°	s mg/cm ³	v/e 10 ⁻⁹ .LP.min ⁻¹ . cm ³ ⁻¹ par γ/cm ³ trypsine	v/es 10 ⁻⁹ .LP.min ⁻¹ . mg ⁻¹ par γ/cm ³ trypsine	Km mg/cm ³	V/e 10 ⁻⁹ .LP.min ⁻¹ . cm ³ ⁻¹ par γ/cm ³ trypsine
45	44°C	5,25	10,5	2,0	1,2	14
		3,14	10,4	3,3		
		2,14	8,6	4,0		
		1,16	6,4	5,5		
		0,52	3,7	7,7		
		0,52	3,9	7,7		
46	44°C	3,5	10,4	2,95	0,95	13,3
		2,1	9,0	4,25		
		1,4	8,0	5,8		
		0,7	5,55	7,9		
		0,42	3,80	9,1		
		0,59	3,60	10,3		
47	35°C	10,0	5,5	6,55	0,8	6,0
		9,0	5,3	0,59		
		6,05	4,7	0,79		
		3,9	4,7	1,2		
		3,2	4,7	1,4		
		1,0	2,2	3,2		
		1,0	3,4	3,4		
48	20°C	5,0	1,06	0,21	0,5	1,0
		3,0	1,06	0,21		
		2,0	0,91	0,45		
		1,0	0,80	0,80		
49	20°C	3,5	1,41	0,40	0,9	1,5
		0,7	0,71	1,0		
		0,35	0,52	1,48		
50	14°7	8,95	0,76	0,085	1,4	0,8
		4,83	0,68	0,14		
		3,26	0,57	0,18		
		1,08	0,38	0,35		

Exp. 45 et 46 e = 14 γ/cm³

Exp. 47 e = 10 γ/cm³

Exp. 48 moyenne des résultats obtenus avec e = 17 γ/cm³ et 50 γ/cm³
lactoglobuline chauffée 6 h. au lieu de 4 h. à 60°.

Exp. 49 e = 50 γ/cm³ imprécision sur la détermination des vitesses

Exp. 50 e = 38 γ/cm³ initiales.

3. COMPARAISON DES PROTEOLYSES DES FORMES NATIVE ET DENATUREES.

DISCUSSION.

3.1 Constantes de Michaelis.

Nous avons trouvé des constantes de Michaelis qui ne diffèrent pas de façon significative, que la lactoglobuline soit sous forme native ou dénaturée. Dans la limite des erreurs expérimentales, aucune de ces constantes ne varie avec la température entre 20° et 45°C. Les valeurs trouvées sont 3 mg/cm³ pour la lactoglobuline native et 1 mg/cm³ environ pour les deux formes dénaturées. Comme celles-ci sont différemment polymérisées et ont, d'après Briggs et Hull [9] des poids moléculaires de 187.000 (forme "s") et 820.000 (forme "f"), les constantes de Michaelis exprimées en molécule-gramme sont alors respectivement $4,3 \cdot 10^{-6}$ et $0,97 \cdot 10^{-6}$, alors que celle de la forme native est $80 \cdot 10^{-6}$.

3.11 liaisons peptidiques accessibles.

Il ne semble pas logique d'exprimer en moles les constantes de Michaelis de proteolyse. En effet, le substrat n'est pas la molécule protéique mais la liaison peptidique. La concentration de substrat est en réalité celle des liaisons peptidiques qui répondent à trois conditions:

- 1) elles doivent avoir la spécificité requise pour se combiner à la trypsine,
- 2) elles doivent être accessibles, c'est-à-dire ne pas être masquées par une structure qui empêche l'approche de la molécule de trypsine,
- 3) elles doivent pouvoir se combiner simultanément à la trypsine, c'est-à-dire être disposées sur la molécule à des distances assez grandes. Plusieurs liaisons peptidiques accessibles, mais rapprochées, ne compteront que pour une seule dans le calcul de la concentration du substrat "liaison peptidique accessible".

Or, on ne connaît pas, ni pour la forme native, ni pour les formes dénaturées, la concentration des liaisons peptidiques accessibles. Celle-ci n'a à priori aucun rapport avec le nombre de liaisons coupées après l'hydrolyse complète de la molécule, de nouvelles liaisons pouvant en

effet devenir accessibles au fur et à mesure que la molécule se dégrade.

Nous pouvons chercher à évaluer la limite supérieure de ce nombre. Von [71] a montré que la protéolyse de la lactoglobuline native était inhibée totalement par les ions ammonium aux pH inférieurs à 8,0. Un seul groupe ammonium participe à cette inhibition; donc on peut admettre que la fixation d'un groupe ammonium à proximité d'une liaison peptidique suffit à empêcher la coupure de cette liaison. D'autre part, des mesures potentiométriques ont montré que le nombre maximum de groupes NH_4^+ fixés par molécule de lactoglobuline était voisin de 12. Il y aurait donc au maximum 12 liaisons peptidiques accessibles par molécule.

L'étude de la fixation du calcium donne un chiffre analogue. Ce raisonnement est lié à l'hypothèse qu'un groupe ammonium fixé n'influence qu'une seule liaison peptidique.

On peut également évaluer le nombre de liaisons peptidiques accessibles en s'inspirant du travail de Waley et Watson [66]. En étudiant la protéolyse par la trypsine de chaînes plus ou moins longues de polylysine et en analysant par chromatographie la taille des peptides formés, ces auteurs ont montré que les liaisons coupées étaient toujours situées vers la troisième à la cinquième position à partir du bout de la chaîne. Or, ce nombre de bouts de chaîne a été déterminé pour la lactoglobuline par Porter qui a trouvé trois résidus N-terminaux, que la protéine soit native ou dénaturée [57].

On peut donc supposer que la polymérisation ne modifie pas le nombre de liaisons peptidiques accessibles totales, c'est-à-dire que le nombre de liaisons peptidiques accessibles par poids de protéine ne sera pas changé si les molécules sont des polymères 4 ou des polymères 20; cette supposition est soutenue par le fait que les deux formes dénaturées "s" et "f" ont les mêmes constantes de Michaelis exactement, lorsque celles-ci sont exprimées en mg/cm^3 .

C'est donc cette façon d'exprimer K_m que nous utiliserons afin de comparer les affinités de la trypsine pour la forme native et les formes dénaturées de la lactoglobuline.

3.12 Homogénéité des solutions protéiques.

Il faut donc considérer la solution protéique comme un mélange d'un grand nombre de liaisons peptidiques n'ayant pas toutes la même affinité pour la trypsine ou la même possibilité d'être coupées. Parmi toutes ces liaisons, certaines seront hydrolysées plus rapidement que les autres parce que le rapport k_2/K_m correspondant est le plus grand. Pratiquement, c'est l'hydrolyse de ces liaisons peptidiques que nous étudions.

D'autre part, on sait que la lactoglobuline, lorsqu'elle est étudiée par électrophorèse à un pH légèrement inférieur au point isoélectrique (Li [38], Polis et coll. [56]) n'est pas homogène. Ces auteurs interprètent cette inhomogénéité comme due soit à une différence fondamentale dans la structure de la molécule protéique, soit à la combinaison de cette molécule avec un autre composant, provoquant un changement dans la dissociation des groupes ionisables. L'important serait de savoir si les deux composants éventuels présentent une différence au point de vue de leur protéolyse: si l'un et l'autre ont des liaisons peptidiques accessibles avec des affinités comparables ou si la différence de structure ou d'ionisation des molécules en fait réellement deux substrats distincts. Nous avons pu montrer que la lactoglobuline se détruisait de façon homogène pendant la plus grande partie de la protéolyse. Elle ne se comporte donc pas comme la sérumalbumine (Gorini et Audrain [24]).

3.13 Comparaison des affinités de la trypsine pour les formes native et dénaturées.

Nous allons donc comparer les constantes de Michaelis en les exprimant en mg/cm^3 . Nous pouvons alors déduire des résultats que nous avons obtenus un certain nombre d'informations: le fait que la trypsine a la même affinité pour la lactoglobuline "s" obtenue par chauffage à 100°C pendant 10 minutes que pour la forme "f" qui a subi le même traitement, puis a été chauffée 4 heures à 60° (dont les groupes sulfhydriles sont par conséquent oxydés), laisse supposer que cette oxydation ne modifie pas non plus l'affinité pour la trypsine.

La différence d'affinité de la trypsine pour la forme native et

pour les formes dénaturées peut être due, si nous n'envisageons que les cas extrêmes:

- soit à la multiplication par trois du nombre des liaisons peptidiques accessibles,
- soit à une modification de la qualité des liaisons peptidiques, sans changement de leur nombre par rupture d'une ou plusieurs liaisons secondaires avoisinantes; la trypsine peut mieux se combiner à ces liaisons peptidiques et l'affinité pour chacune d'elles serait augmentée d'un facteur trois.

On peut répondre à cette alternative en examinant les variations avec la température de la réaction de dégradation du complexe intermédiaire: dans le premier cas, l'énergie d'activation sera la même pour les formes native et dénaturées, dans le deuxième, elle sera plus faible avec la forme dénaturée.

Comme nous avons trouvé que l'énergie d'activation est modifiée par la dénaturation nous concluerons qu'il y a modification de la structure au voisinage des liaisons peptidiques accessibles sans changement du nombre de ces liaisons.

3.14 Comparaison avec les données bibliographiques.

Il est curieux de remarquer que les rares déterminations de constantes de Michaelis correspondant à l'hydrolyse des protéines ont donné des résultats analogues, voisins de 10^{-4} M. Citons la valeur correspondant à la protéolyse par la trypsine de la trypsine-diisopropyl-phosphorylée (trypsine-DIP) ou de la trypsine-diéthyl-phosphorylée (trypsine-DEP), soit $3 \cdot 10^{-4}$ M (Gorini et Felix [25]).

Waley et Watson [66], pour l'hydrolyse par la trypsine de la polylysine, trouvent $4,8 \cdot 10^{-4}$ à $2,0 \cdot 10^{-4}$ M respectivement pour les polymères 19 et 230.

L'hydrolyse, toujours par la trypsine, des liaisons amides du benzoyl-l-argininamide (Harmon et Niemann [28]) est caractérisé par des constantes de Michaelis plus élevées ($21 \cdot 10^{-4}$ M), tandis que, pour la liaison ester du benzoyl-l-argininéméthylester, on a encore $0,8 \cdot 10^{-4}$ M (Schwert et Eisenberg [58]).

Pour donner un ordre de grandeur, la constante de dissociation du complexe trypsine-inhibiteur protéique est environ 10^{-10} M (Green [26]).

3.15 Variations avec la température.

Nous avons trouvé que la constante de Michaelis des formes native et dénaturées ne varient pas avec la température entre 20° et 45°C, que, dans le même intervalle, k_2 est multiplié par un facteur supérieur à 10; nous en avons conclu qu'il est possible d'assimiler K_m à K : constante de dissociation du complexe enzyme-substrat. ΔH , la chaleur de formation du complexe trypsine-lactoglobuline (native ou dénaturée) est donc nulle. Par conséquent, toute la variation d'énergie libre est liée à une variation positive d'entropie. Si, pour la lactoglobuline native, on calcule ΔF en exprimant les affinités en mole^{-1} , on trouve -5.800 cal./mol. et $\Delta S = +19 \text{ cal./degrés.}$ Cette valeur n'a pas de signification physique; son ordre de grandeur ne serait toutefois pas modifié si l'on exprimait les concentrations de la seule façon correcte, c'est-à-dire en liaisons peptidiques accessibles. Casey et Laidler [13] ont trouvé des valeurs analogues pour l'hydrolyse par la pepsine d'un dipeptide de synthèse, le carbobenzoxy-L-glutamyl-L-tyrosine ($\Delta H = 3.000 \text{ cal./mol.}$ et $\Delta S = +18 \text{ cal./degrés.}$).

Le complexe enzyme-substrat se forme donc avec une désorganisation importante. La liaison est faible. Cette désorganisation peut se faire soit par départ d'un grand nombre de molécules d'eau selon l'interprétation classique, soit par désorganisation du substrat, soit, comme l'ont suggéré Casey et Laidler, par une désorganisation de l'enzyme qui reviendrait à son état initial lors de l'activation du complexe intermédiaire. Ainsi s'expliquerait la variation négative d'entropie qu'on observe généralement à ce stade. Quoi qu'il en soit, on possède actuellement fort peu de données expérimentales au sujet de l'hydrolyse des liaisons peptidiques. Kaufman, Neurath et Schwert [34] ont étudié les variations de la constante de Michaelis du système chymotrypsine benzoyl-tyrosinamide. La chaleur de réaction apparente est $-10.900 \text{ cal./mol.}$ ($\Delta S = -30 \text{ cal./degrés, } \Delta F = -1.900 \text{ cal./mol.}$).

3.2 Constantes de vitesse de décomposition du complexe enzyme-substrat.

Nous avons montré (cf. II, §1.72) que la vitesse d'attaque de la lactoglobuline native, exprimée en molécule-gramme par minute ($R_i = 38.000$) est numériquement égale à 1/100ème de la valeur des vitesses mesurées en liaisons peptidiques détruites par minute. En ce qui concerne la lactoglobuline dénaturée, nous n'avons pas jusqu'à présent vérifié la proportionnalité ni déterminé le coefficient correspondant. Des mesures indicatives ont toutefois

semblé indiquer qu'à poids égal de substrat, en fin de protéolyse, le même nombre de liaisons peptidiques étaient coupées sur la lactoglobuline native et sur les formes "s" et "f".

3.21 Energies d'activation.

On peut alors comparer les valeurs des constantes de vitesse de décomposition du complexe intermédiaire à différentes températures. La figure 23 montre l'ensemble des résultats expérimentaux (excepté les expé-

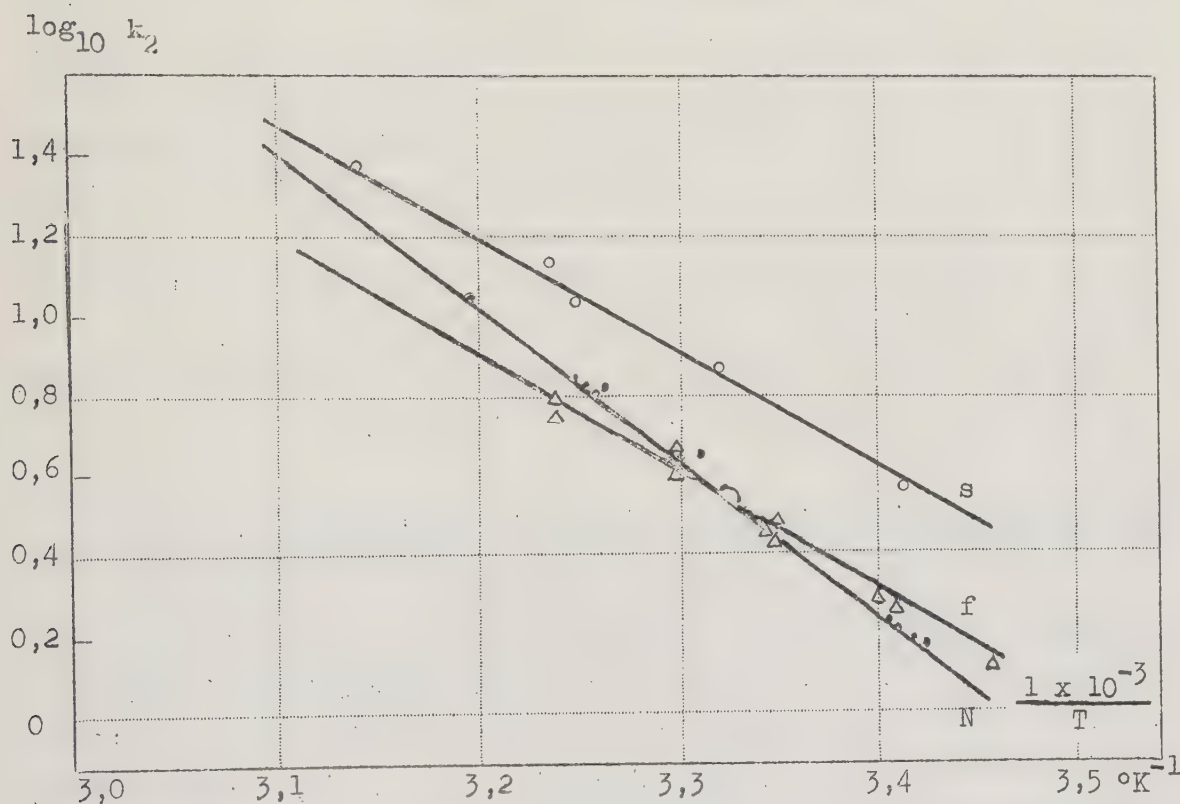


Figure 23.

Comparaison des énergies d'activation de décomposition du complexe enzyme-substrat pour la protéolyse de la lactoglobuline native et des lactoglobulines dénaturées par la chaleur "s" et "f".

En abscisses: $1/T$ (degrés K) $^{-1}$.

En ordonnées: $\log_{10} \frac{v \cdot (K_m + s)}{e \cdot s}$ (voir texte).

riences faites à 20°C avec 170 γ/cm^3 de trypsine avec la lactoglobuline N) sous la forme suivante: en abscisses, l'inverse des températures absolues en (degrés Kelvin)⁻¹ et en ordonnées, le logarithme de la vitesse maxima calculée d'après la formule:

$$k_2 = \frac{V}{e} = \frac{v}{e} \cdot \frac{(K_m + s)}{s}$$

(avec $K_m = 3 \text{ mg/cm}^3$ pour "N", $K_m = 0,9 \text{ mg/cm}^3$ pour "s" et "f"). On constate qu'aux températures inférieures à 27°C environ, la plus faible des constantes de vitesse correspond à la décomposition du complexe trypsine-lactoglobuline native; comme celle-ci croît plus rapidement que les autres lorsque la température augmente, elle devient supérieure à la constante $k_2)_f$ de décomposition du complexe trypsine-lactoglobuline "f" au-dessus de 27°C, puis, si l'extrapolation est justifiée, elle devient supérieure à $k_2)_s$ au-dessus de 57°C environ.

La vitesse de protéolyse de la lactoglobuline dénaturée n'est donc pas toujours supérieure à celle de la lactoglobuline native.

La figure 24, qui montre à 44° les droites correspondant à la variation $v = f(v/s)$, met également ce fait en évidence.

3.22 Variation d'énergie libre, d'entropie et d'enthalpie.

Dans le tableau XIII se trouvent les valeurs des fonctions thermodynamiques ΔF^* , ΔH^* , ΔS^* , calculées comme nous l'avons indiqué (cf. I § 1.22), concernant le passage du complexe ES de son état stable à l'état activé. On voit que la variation d'énergie libre est à peu près la même, que le substrat soit N, "s" ou "f". Mais l'importance relative des deux termes ΔH^* et $T\Delta S^*$ varie assez considérablement: quand le substrat est la lactoglobuline native, le premier terme est le plus important, la diminution d'entropie n'apportant qu'une faible contribution à l'augmentation d'énergie libre. Avec l'une quelconque des formes dénaturées au contraire, $T\Delta S^*$ compte pour un tiers dans la variation d'énergie libre.

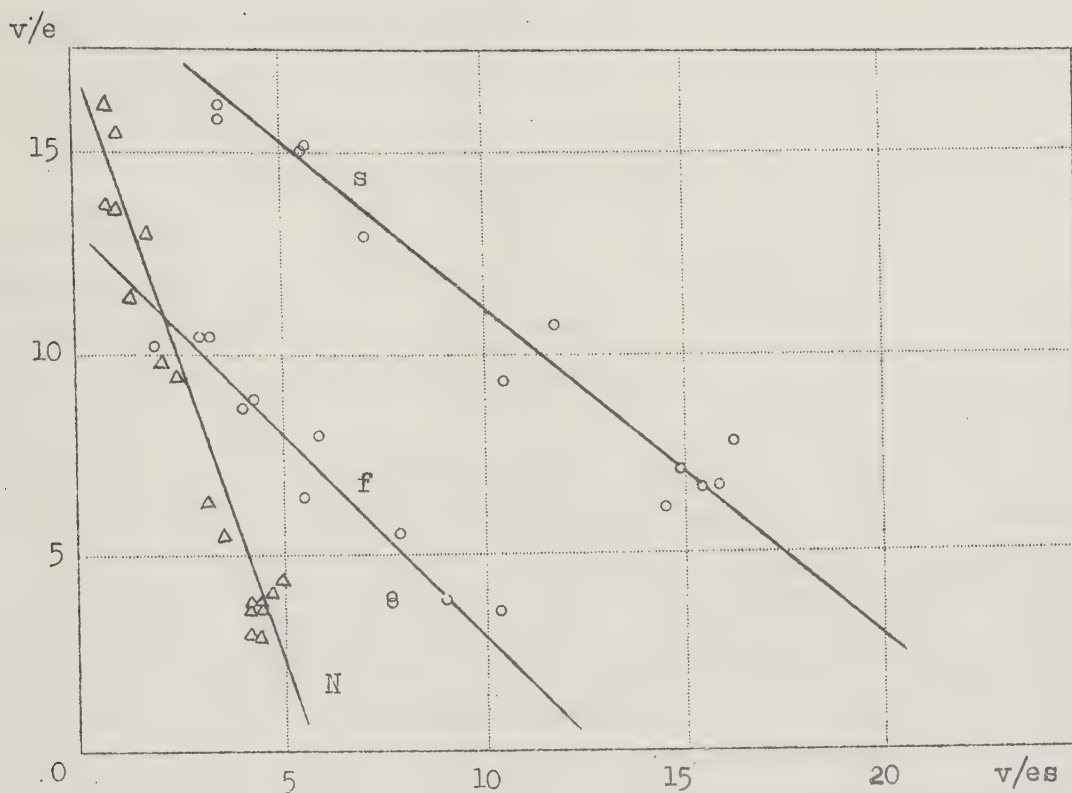


Figure 24. Comparaison des vitesses de protéolyse pour différentes concentrations de substrat, pour la lactoglobuline native N, et pour les lactoglobulines dénaturées par la chaleur "s" et "f".

En abscisses : v/es ($10^{-9} \cdot LP \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ par γ/cm^3 de trypsine)
 En ordonnées : v/e ($10^{-9} \cdot LP \cdot min^{-1} \cdot cm^3^{-1}$ par γ/cm^3 de trypsine).

La pente est égale à K_m exprimée en mg/cm^3 .

L'ordonnée à l'origine est V/e .

TABEAU XIII

Lactoglobuline	native "N"	dénaturée "s"	dénaturée "f"
$\frac{V}{e} 35^\circ \left(\frac{LP}{min \cdot cm^3} \right) \text{ par } \frac{\gamma}{cm^3}$	$7,3 \cdot 10^{-9}$	$10 \cdot 10^{-9}$	$5,9 \cdot 10^{-9}$
$k_2)_{35^\circ} \text{ sec}^{-1}$	0,15	0,20	0,12
$\Delta F^*_{35^\circ} \text{ calories/mol.}$	19.400	19.200	19.500
$\mu \text{ calories/mol.}$	18.600	14.200	14.200
$\Delta H^\# \text{ calories/mol.}$	18.000	13.600	13.600
$\Delta S^* \text{ cal./degrés/mol.}$	-1,5	-18	-19

k_2^0 représente la vitesse exprimée en molécule-gramme par litre de substrat détruite par seconde, par molécule-gramme par litre d'enzyme. Il est calculé pour les trois formes en admettant que la rupture de 20 liaisons peptidiques correspondent à l'attaque de 38.000 g de substrat (soit une molécule-gramme pour la lactoglobuline native).

Linderström-Lang, Hotchkiss et Johansen [41] ont montré dès 1938 que l'énergie d'activation de la réaction de protéolyse est plus faible quand la lactoglobuline est dénaturée. Le Q_{10} est 1,9 pour la lactoglobuline dénaturée et 3,3 pour la lactoglobuline native entre 30° et 40°C. On peut calculer les énergies d'activation correspondantes qui sont respectivement de 13.000 et 24.000 cal./mol. à pH 7,0. Le milieu n'est pas précisé, l'enzyme était de la trypsine non purifiée, la protéolyse était suivie par la méthode trichloracétique.

Nos résultats confirment la différence des énergies d'activation puisque nous trouvons 18.600 cal./mol. pour la lactoglobuline native et 14.200 cal./mol. pour les deux formes dénaturées à pH 8,0 en milieu NaCl 0,1 N. Nous n'avons pas constaté d'influence du tampon borate M/20 sur l'énergie d'activation correspondant à la lactoglobuline native. Yon [70], à pH 7,0, en tampon phosphate 0,1 M, a trouvé $\mu = 19.000$ cal./mol. tandis qu'en tampon borate M/5: $\mu = 28.000$ cal./mol. Cette valeur anormale est due à l'existence d'un équilibre entre le borate et la lactoglobuline, dont la constante varie fortement avec la température.

Linderström-Lang et Levi [40], en milieu $\text{ClNH}_4\text{-NH}_3$, dont la composition (et non le pH) est maintenue constante quelle que soit la température, obtiennent des chiffres très différents et qui varient avec la température.

On ne précise généralement pas dans les tableaux récapitulatifs en quels milieux ont été mesurées les énergies d'activation, il semble donc que cette lacune soit regrettable.

Des valeurs de ΔH égales à 13.000 ou 18.000 cal./mol. paraissent faibles pour être compatibles avec l'hypothèse de l'explosion de la molécule protéique par rupture simultanée de plusieurs liaisons peptidiques.

On pourrait concevoir que la variation de $\Delta S^\ddagger$ et $\Delta H^\ddagger$ nécessaire pour couper une liaison peptidique dans une chaîne polypeptidique est celle

qui correspond à la forme dénaturée, soit $\Delta S^* = -18 \text{ cal./degrés}$ et $\Delta H^\ddagger = 13.800 \text{ cal.}$ Dans la molécule native, pour pouvoir rompre cette liaison peptidique, il faudrait couper simultanément une liaison secondaire; la chaleur de réaction serait donc augmentée, ainsi que les degrés de liberté de mouvement. Au cours de l'activation, il y aurait donc coupure d'une liaison secondaire caractérisée par

$$\Delta H^\ddagger = \Delta H_N^\ddagger - \Delta H_D^\ddagger = \sim 4.500 \text{ cal.}$$

$$\Delta S^* = \Delta S_N^* - \Delta S_D^* = \sim +14 \text{ U.E.}$$

$\Delta H^\ddagger$ et ΔS^* sont équivalents aux chiffres donnés par Stearn [61] pour la rupture d'une liaison hydrogène, mais n'importe quelle liaison de faible énergie donnera des valeurs semblables.

Butler [10] a étudié la protéolyse par la trypsine du benzoyl-L-argininamide et de la sturine (protamine dont le poids moléculaire est environ 3500). Les résultats sont respectivement -4,7 et -6 cal./degrés pour ΔS^* , 16.900 et 11.800 cal./mol. pour $\Delta H^\ddagger$. Ils sont analogues aux valeurs trouvées pour la lactoglobuline native. Il serait important d'étudier sur d'autres substrats protéiques l'influence de la dénaturation sur les valeurs de ΔS^* , afin de voir si elles sont systématiquement négatives et grandes en valeur absolue.

3.3 Discussion des résultats en rapport avec l'hypothèse de la dénaturation préalable.

Nous avons examiné dans la première partie l'hypothèse de Linderström-Lang selon laquelle la protéolyse des protéines natives se ferait avec un processus initial de dénaturation; cette dénaturation pourrait être spontanée et résulter d'un équilibre entre la forme native et la forme dénaturée analogue à celui qu'on a pu mettre en évidence dans la dénaturation de l'hémoglobine par le salicylate [2], ou de la trypsine par la chaleur [50]. Linderström-Lang, Hotchkiss et Johansen [41] ont comparé les vitesses de protéolyse de deux parties aliquotes d'une même solution de lactoglobuline chauffée 1 minute à 100°C, mesurées soit immédiatement, soit après 24 heures, et ont constaté que la première était

hydrolysée avec une vitesse plus grande et que son coefficient de température était sensiblement plus petit; cette expérience semble donc indiquer que la dénaturation par la chaleur de la lactoglobuline est réversible dans ces conditions expérimentales.

Aux températures basses, vers 20 à 45°, on n'a jamais mis en évidence un tel équilibre. On sait seulement que vers pH 8,0 [27] et aux pH plus alcalins, la lactoglobuline se dénature lentement et irréversiblement pour donner une fraction insoluble au point isoélectrique.

Linderström-Lang [40] envisage la possibilité que cette "dénaturation" soit catalysée par l'enzyme protéolytique lui-même.

Cette idée a été suggérée par des expériences sur la contraction (électrostriction) accompagnant la libération de charges lors de la rupture des liaisons peptidiques par les enzymes protéolytiques [42].

Alors que cette contraction est d'environ 20 cm³/mol. pour l'hydrolyse d'une liaison peptidique d'un dipeptide ou de la lactoglobuline dénaturée par la chaleur, elle est de 35 cm³/mol. pour la lactoglobuline native dans la partie initiale de la protéolyse.

Linderström-Lang et Jacobsen envisagent donc que l'excès de contraction soit dû à une libération de charges supplémentaires comme il pourrait s'en produire par dénaturation avec rupture de liaisons internes; ce processus de désorganisation précéderait ou accompagnerait la simple destruction des liaisons peptidiques.

Christensen, au cours d'un très important travail sur la protéolyse de la lactoglobuline par la trypsine [16], a essayé d'apporter des indications supplémentaires. Il a tenté, par de multiples méthodes, de mettre en évidence cette dénaturation. Effectivement, il a montré qu'il se formait au cours de la protéolyse un ou des produits qui ont les propriétés de la lactoglobuline dénaturée: insolubilité au point isoélectrique, forte viscosité, pouvoir rotatoire plus élevé. La concentration de cette fraction "dénaturée" augmente au cours de la protéolyse et atteint une sorte de plateau puis décroît légèrement. Elle augmente d'autant plus vite que la concentration en trypsine est plus forte. Toutefois, le plateau n'est atteint que lorsqu'environ 80 % du substrat est hydrolysé.

Il y a lieu de penser que cette fraction peut être l'un des produits

de la protéolyse, qui se forme en même temps que les produits de faible poids moléculaire. Peut-être est-il identique à la fraction que nous avons mise en évidence par électrophorèse sur papier (cf.II, § 1.72) et qui résulte de la coupure d'une vingtaine de liaisons peptidiques sur la molécule de lactoglobuline. Cette fraction est insoluble en milieu aqueux et en tampon acétate, son point isoélectrique est voisin de pH 4,5 puisqu'elle ne migre pratiquement pas à ce pH. Puisque la protéolyse complète de la lactoglobuline donne 35 liaisons peptidiques, cette fraction peut avoir une vitesse de dégradation lente par rapport à celle de la lactoglobuline native. Il est possible que son poids moléculaire ne soit pas assez différent de celui de la protéine native pour qu'on puisse les distinguer par ultracentrifugation. Nous avons vu en effet qu'on ne mettait en évidence que deux fractions par cette méthode: l'une a la même vitesse de sédimentation que la lactoglobuline native, l'autre, de faible poids moléculaire, ne sédimente pas en 100 minutes à 250.000 g (cf.II, § 1.8).

Quoi qu'il en soit, nous allons essayer d'interpréter nos résultats cinétiques expérimentaux selon l'une ou l'autre des hypothèses de dénaturation:

1. dénaturation réversible,
2. dénaturation catalysée par la trypsine.

3.31 Dénaturation réversible.

Nous avons montré (cf.I, § 2.2) que si le mécanisme de la réaction de protéolyse obéit au schéma proposé par Linderström-Lang (équilibre $N \rightleftharpoons D$ et protéolyse de la forme dénaturée), la relation qui lie les vitesses de réaction aux concentrations d'enzyme et de substrat est de la forme:

$$\frac{p \cdot Km_D \cdot (K_d + 1)}{1 + k_2/k_d} = (e - p) \left(\frac{s}{1 + k_2/k_d} - p \right)$$

dans laquelle K_d est la constante d'équilibre de dénaturation, soit k'_d/k_d . Nous avons discuté les différents aspects que peut prendre la réaction pour les différentes grandeurs relatives de k_2 , k_d d'une part, de

e , s et $(Km)_D(K_d+1)$ d'autre part.

Lorsque les vitesses de réaction sont proportionnelles aux concentrations d'enzyme, la relation précédente se simplifie en:

$$p(Km)_D(K_d+1) = (e - p)s$$

La constante de Michaelis déterminée avec la forme native serait donc:

$$(Km)_N = (Km)_D \cdot (K_d+1)$$

Les vitesses de réaction correspondant aux formes native et "dénaturée" seraient alors respectivement:

$$v_N = k_2 e s / [(Km)_D \cdot (K_d+1) + s]$$

et
$$v_D = k_2 e s / [(Km)_D + s]$$

Pour des faibles concentrations en substrat, les énergies d'activation, calculées à partir des vitesses de réaction, doivent donc être différentes lorsque le substrat est sous la forme native ou sous la forme dénaturée. Mais lorsque ces énergies d'activation sont déterminées par les variations de k_2 avec la température, elles doivent être les mêmes dans les deux cas.

D'autre part, lorsque la température varie, la constante de Michaelis apparente de la forme native aura un coefficient de température tel que:

$$\frac{d(Km)_N}{(Km)_N} = \frac{d(Km)_D}{(Km)_D} + \frac{dK_d}{K_d+1}$$

Généralement, les équilibres de dénaturation en absence d'agents dénaturants comme l'urée ou le salicylate [2], ont un fort coefficient de température [50].

Evidemment, la lactoglobuline dénaturée par la chaleur que nous avons étudiée n'est pas la lactoglobuline "dénaturée" telle qu'elle est supposée par Linderström-Lang puisqu'il est à priori impossible de la séparer de la forme native. Mais nous avons étudié deux formes différentes et toutes deux avaient des propriétés voisines: la forme "s", qui

résulte du premier stade de la dénaturation est celle qui, logiquement, doit ressembler davantage à la forme D hypothétique.

Pour des concentrations en trypsine inférieures à 50 γ /cm³, les vitesses trouvées dans nos expériences sont proportionnelles aux concentrations d'enzyme, donc, dans cette zone, il est possible de déterminer des constantes de Michaelis. Nous avons constaté:

- 1) que l'énergie d'activation, calculée sur k_2 , est plus faible pour la forme dénaturée ("s" ou "f") que pour la forme native;
- 2) qu'aucune des constantes des Michaelis concernant la forme native et les formes dénaturées "s" et "f" ne varie avec la température.

Ces deux faits semblent donc contradictoires avec l'hypothèse d'un équilibre réversible entre une forme native non attaquable par la trypsine et une forme dénaturée attaquable.

3.32 Dénaturation catalysée par la trypsine.

Selon les expériences de Linderström-Lang et Jacobsen [42] d'une part et de Christensen [16] d'autre part, il semble que, dans la protéolyse de la lactoglobuline, cette éventuelle dénaturation ne soit pas un processus rapide; sa vitesse serait seulement légèrement supérieure à la vitesse de protéolyse de la forme "dénaturée", de sorte que cette forme "dénaturée" s'accumulerait lentement. Du point de vue cinétique, ceci semble contradictoire avec le fait que les vitesses de réaction mesurées par la rupture des liaisons peptidiques sont constantes pendant la partie initiale de l'hydrolyse de la lactoglobuline native; nous n'avons jamais pu observer de points d'inflexion dans les cinétiques de protéolyse. La proportionnalité observée entre le nombre de liaisons peptidiques détruites et le pourcentage de lactoglobuline hydrolysée, tel qu'il a été observé par électrophorèse sur papier (cf. II § 1.72), lorsque le pourcentage de protéolyse varie entre 0 et 80 %, nous semble un argument supplémentaire contre cette réaction initiale.

3.33 Conclusions

La comparaison de la protéolyse de la lactoglobuline native avec celle des formes dénaturées par la chaleur a montré:

1. que l'affinité pour la forme dénaturée est peu différente de l'affinité pour la forme native,

2. que cette différence ne correspond pas à une variation du nombre des liaisons peptidiques accessibles mais à une modification structurale telle que l'énergie nécessaire pour couper la liaison peptidique est plus grande lorsque cette liaison peptidique se trouve sur la protéine native que lorsqu'elle se trouve sur la protéine dénaturée;

3. Que l'écart correspondrait à la coupure supplémentaire, par liaison peptidique de la lactoglobuline native, d'une ou de plusieurs liaisons secondaires telles que la variation totale d'enthalpie soit environ 4.500 cal./mol. et la variation totale d'entropie soit +14 U.E. On peut imaginer qu'il s'agit de liaisons hydrogènes.

Cette interprétation soulève forcément toutes sortes de réserves, puisqu'elle est basée sur une variation globale de l'énergie et non sur une analyse de la répartition de cette énergie entre différents processus concomitants.

Elle serait en accord avec le schéma suivant que nous suggérons pour la protéolyse de la lactoglobuline native:



Le complexe $NE)_D^*$ est formé à partir de NE par étirement d'une liaison peptidique et coupure d'une ou d'un très petit nombre de liaisons de faible énergie (liaisons hydrogène par exemple). Le complexe $NE)_D^*$ est donc légèrement dénaturé, si on peut considérer comme dénaturation la coupure de quelques liaisons secondaires. Cette "dénaturation" ne serait donc pas antérieure à la coupure de la liaison peptidique, mais elle accompagnerait cette coupure pendant le processus d'activation du complexe intermédiaire.

SOMMAIRE

1. La comparaison du titrage des liaisons peptidiques détruites au cours de la protéolyse, avec la mesure de la lactoglobuline non modifiée, par des techniques d'électrophorèse, a montré que la destruction d'une molécule de la protéine correspond au titrage de 20 liaisons peptidiques pendant la plus grande partie de la réaction.

2. La constante de Michaelis pour la lactoglobuline native en NaCl 0,1 N ne varie pas avec la température entre 20° et 45°. Sa valeur est 3 mg/cm³ ou $0,8 \cdot 10^{-4}$ M à pH 8,0.

3. La constante de Michaelis pour les deux formes "s" et "f" de lactoglobuline dénaturée par la chaleur ne varie pas avec la température, sa valeur est 1 mg/cm³ à pH 8,0.

4. L'énergie d'activation de la décomposition du complexe enzyme-substrat est 18.600 cal./mol. pour la forme native, 14.200 cal./mol. pour les formes dénaturées; l'erreur expérimentale est au maximum de 500 cal./mol.

5. Les variations d'énergie libre correspondant à l'activation du complexe sont $\Delta F^* = 19.400$ cal./mol. pour la forme native, 19.200 cal./mol. pour la forme "s", 19.500 cal./mol. pour la forme "f". Les variations d'enthalpie sont $\Delta H^\ddagger = 18.000$ cal./mol. pour la forme native, 13.600 cal./mol. pour les deux formes dénaturées. La variation d'entropie ΔS^* est -4,4 cal./degré pour la forme native, -18 cal./degré pour "s" et -19 cal./degré pour "f".

6. Les valeurs relatives des constantes de vitesse de décomposition du complexe enzyme-substrat correspondant aux formes native, "s" et "f" (soit respectivement k_{2N} , k_{2s} et k_{2f}) changent avec la température. Le rapport k_{2s}/k_{2f} est constant et voisin de 2. k_{2N} est inférieur à k_{2s} et k_{2f} au-dessous de 27°; il est compris entre k_{2s} et k_{2f} entre 27 et 45°.

L'extrapolation des résultats indique qu'il devient supérieur à k_{2s} au-dessus de 57° .

La vitesse d'hydrolyse de la forme dénaturée "f" n'est donc pas toujours supérieure à celle de la forme native.

7. La protéolyse de la lactoglobuline native à pH 8,0 et 35°C est fortement inhibée par le borate M/10. Le borate M/20 est faiblement activateur.

8. Le rapport des constantes de vitesse de décomposition du complexe à 45° et 20° , $k_2)_{45}/k_2)_{20}$, étant supérieur à 10 et K_m (égal à $(k_1'+k_2)/k_1$) étant constant dans le même intervalle de température, la constante de Michaelis se confond avec la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat.

9. Comme l'affinité de la trypsine pour la forme native est peu différente de celle pour la forme dénaturée, que, d'autre part, l'énergie d'activation de l'hydrolyse des liaisons peptidiques est différente pour ces deux formes, il apparaît que la dénaturation modifie non pas le nombre de liaisons peptidiques accessibles, mais la structure de ces liaisons, probablement par rupture de liaisons secondaires avoisinantes.

10. En ce qui concerne l'hydrolyse de la lactoglobuline native, les résultats, dans leur ensemble, sont favorables à l'idée de la rupture d'une ou de quelques liaisons secondaires au cours du passage du complexe à sa forme activée, corrélativement avec l'étirement de la liaison CO-NH. Ils ne semblent pas compatibles avec l'existence d'un équilibre réversible entre une forme native non attaquable et une forme dénaturée attaquable par l'enzyme protéolytique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. ANNETTS. The digestion products formed by the action of papain on egg albumin.
Biochem.J., 1936, 30, 1807.
- [2] M. L. ANSON and A. E. MIRSKY. The equilibrium between native and denatured hemoglobin in salicylate solutions.
J. Gen. Physiol., 1933, 17, 399.
- [3] A. K. BALLS and E. F. JANSEN. Stoichiometric inhibition of chymotrypsin.
Adv. in Enzymol., 1952, 13, 321.
- [4] A. BELOFF and C. B. ANFINSEN. The products of proteolysis of some purified proteins.
J. Biol. Chem., 1948, 176, 863.
- [5] T. BERSIN and S. BERGER. Ueber Substrathemmungen bei der tryptischen und peptischen Proteolyse.
Z. Physiol. Chem., 1948, 283, 74.
- [6] P. BOULANGER et G. BISERTE. Variations du pouvoir rotatoire au cours de l'hydrolyse pepsique de protéines.
C. R. Soc. Biol., 1946, 222, 1261.
- [7] W. B. BRIDGMAN. The peptic digestion of human gamma globulin.
J. Am. Chem. Soc., 1946, 68, 857.
- [8] G. E. BRIGGS and J. B. S. HILDANE. A note on the kinetics of enzyme action.
Biochem.J., 1925, 19, 338.
- [9] D. R. BRIGGS and R. HULL. Studies on protein denaturation. I. Electrophoretic study: kinetics at neutrality of heat denaturation of β -lactoglobulin.
J. Am. Chem. Soc., 1945, 67, 2007.
- [10] J. A. V. BUTLER. The molecular kinetics of trypsin action.
J. Am. Chem. Soc., 1941, 63, 2871.
- [11] J. A. V. BUTLER, E. C. DODDS, D. M. P. PHILLIPS and J. M. L. STEPHEN. The action of trypsin on insulin.
Biochem.J., 1949, 44, 225.
- [12] R. K. CANNAN, A. H. PALMER and A. C. KIBRICK. The hydrogen-ion dissociation curve of β -lactoglobulin.
J. Biol. Chem., 1942, 142, 803.
- [13] E. J. CASEY and K. J. LAIDLER. The molecular kinetics of pepsin catalyzed reactions.
J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 2159.

- [14] A.CECIL and A.G.OGSTON. The sedimentation constant, diffusion constant and molecular weight of lactoglobulin.
Biochem.J., 1949,44,33.
- [15] A.C.CHIBNALL, M.W.REES and E.F.WILLIAMS. The total nitrogen content of egg albumin and other proteins.
Biochem.J., 1943,37,354.
- [16] L.K.CHRISTENSEN. Denaturation and enzymatic hydrolysis of lactoglobulin.
C.R.Lab.Carlsberg(Sér.Chim.), 1952,28,N°2.
- [17] E.J.COHN and J.T.EDSALL. Proteins, amino acids and peptides.
Reinhold Publ.Corp., 1943.
- [18] L.W.CUNNINGHAM, F.TIETZE N.M.GREEN.and H.NEURATH. Molecular-kinetic properties of trypsin and related proteins.
Trans.Farad.Soc.Discuss., 1953,58.
- [19] B.T.CURRIE and H.B.BULL. Peptic hydrolysis of egg albumin.
II. Molecular weight distribution of peptides.
J.Biol.Chem., 1951,193,29.
- [20] P.DESNUELLE, M.ROVERY et G.BONJOUR. Quelques nouvelles observations sur le mode d'attaque de la globine de cheval et de l'albumine d'oeuf par la pepsine.
Biochim.Biophys.Acta, 1950,5,116.
- [21] G.S.EADIE. On the evaluation of the constants V_m and K_m in enzymatic reactions.
Science, 1952,116,688.
- [22] K.D.GIBSON. True and apparent activation energies of enzymic reactions.
Biochim.Biophys.Acta, 1953,10,221.
- [23] S.GLASSTONE, K.J.LAIDLER and H.EYRING. The theory of rate processes.
McGraw-Hill Book Co., New York, 1941.
- [24] L.GORINI et L.AUDRAIN. Action de quelques métaux bivalents sur la sensibilité de la sérum albumine à l'action de la trypsine.
Biochim.Biophys.Acta, 1952,9,180.
- [25] L.GORINI et F.FELIX. Sur le mécanisme de protection de la trypsine par Ca^{++} ou Mn^{++} .
Biochim.Biophys.Acta, 1953,11,535.
- [26] N.M.GREEN. Competition among trypsin inhibitors.
J.Biol.Chem., 1953,205,535.
- [27] M.L.GROVES, N.J.HIPP and T.L.McMEEKIN. Effect of pH on the denaturation of β -lactoglobulin and its dodecyl sulfate derivative.
J.Am.Chem.Soc., 1951,73,2790.

- [28] K.M.HARMON and C.NIEMANN. The hydrolysis of N-benzoyl-L-arginine-
amide by crystalline trypsin.
J.Biol.Chem., 1949, 178, 743.
- [29] G.HAUGAARD and R.M.ROBERTS. The digestion of lactoglobulin by
pepsin.
J.Am.Chem.Soc., 1942, 64, 2664.
- [30] V.HENRI. Lois générales de l'action des diastases.
Thèse, Paris, 1903.
- [31] C.F.JACOBSEN. Comparison of different samples of lactoglobulin.
C.R.Lab.Carlsberg(Sér.Chim.), 1947-49, 26, N°18.
- [32] C.F.JACOBSEN. The activation of chymotrypsinogen.
C.R.Lab.Carlsberg(Sér.Chim.), 1947, 25, N°14.
- [33] G.JOHANSEN. The influence of oxygen on irreversible denaturation
of β -lactoglobulin.
C.R.Lab.Carlsberg, (Sér.Chim.), 1953, 28, 334.
- [34] S.KAUFMAN, H.NEURATH and G.W.SCHWERT. The specific peptidase and
esterase activities of chymotrypsin.
J.Biol.Chem., 1949, 177, 793.
- [35] I.M.KLOTZ. Thermodynamic and molecular properties of some metal-
protein complexes.
dans: A Symposium on the mechanism of enzyme action.
John Hopkins Press, 1954.
- [36] F.LABEYRIE et J.YON. Détermination de la constante de Michaelis
dans la protéolyse de la β -lactoglobuline native en
présence de trypsine.
J.Chim.Phys., 1953, 50, 186.
- [37] B.L.LARSON and R.JENNESS. Characterization of the sulfhydryl groups
and the kinetics of the heat denaturation of crystalline
 β -lactoglobulin.
J.Am.Chem.Soc., 1952, 74, 3090.
- [38] C.H.LI. Electrophoretic inhomogeneity of crystalline β -lactoglobulin.
J.Am.Chem.Soc., 1946, 68, 2746.
- [39] K.LINDERSTRÖM-LANG. Volumetric determination of amino nitrogen.
C.R.Lab.Carlsberg, 1927, 17, N°4.
- [40] K.LINDERSTRÖM-LANG. Structure and enzymatic breakdown of proteins.
Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol., 1950, 14, 117.
- [41] K.LINDERSTRÖM-LANG, R.D.HOTCHKISS and G.JOHANSEN. Peptide bonds
in globular proteins.
Nature, 1938, 142, 996.
- [42] K.LINDERSTRÖM-LANG and C.F.JACOBSEN. The contraction accompanying
enzymatic breakdown of proteins.
C.R.Lab.Carlsberg(Sér.Chim.), 1941, 24, 1.
- [43] M.W.LOEWE and D.R.BRIGGS. The number of catalytically active
sites present on the chymotrypsin molecule.
J.Biol.Chem., 1952, 199, 857.

- [44] H.P.LUNDGREN. The catalytic effect of active crystalline papain on the denaturation of thyroglobulin.
J.Biol.Chem., 1941,138,293.
- [45] T.L.McMEEKIN, B.D.POLIS, E.S.DELLA MONICA and J.H.CUSTER.
Heterogeneity of crystalline β -lactoglobulin.
J.Am.Chem.Soc., 1948,70,881.
- [46] L.MICHAELIS et M.L.MENTEN. Die Kinetik der Invertinwirkung.
Biochem.Zts., 1913,49,333.
- [47] L.MILLER. Digestion of crystalline lactoglobulin by crystalline trypsin and chymotrypsin.
C.R.Lab.Carlsberg, 1939,23,45.
- [48] I.MORING-CLAESSON. Frontal analysis studies on the adsorption of crystalline egg albumin and its cleavage products.
Biochim.Biophys.Acta, 1948,2,389.
- [49] H.NEURATH and G.W.SCHWERT. The mode of action of the crystalline pancreatic proteolytic enzymes.
Chem.Rev., 1950,46,69.
- [50] J.H.NORTHROP. Crystalline trypsin. IV. Reversibility of the inactivation and denaturation of trypsin by heat.
J.Gen.Physiol., 1933,16,323.
- [51] J.H.NORTHROP and M.KUNITZ. Crystalline trypsin. III. Experimental procedure and methods of measuring activity.
J.Gen.Physiol., 1933,16,313.
- [52] J.H.NORTHROP, M.KUNITZ and R.M.HERRIOTT. Crystalline enzymes.
Columbia Univ.Press, New York, 1948.
- [53] A.H.PALMER. The preparation of a crystalline globulin from the albumin fraction of cow's milk.
J.Biol.Chem., 1934,104,359.
- [54] K.O.PEDERSEN. Ultracentrifugal and electrophoretic studies on the milk proteins.
Biochem.J., 1936,30,961.
- [55] M.L.PETERMANN. Ultracentrifugal analysis of pepsin-treated serum globulins.
J.Physical Chem., 1942,46,183.
- [56] B.D.POLIS, H.W.SCHMUKLER, J.H.CUSTER and T.L.McMEEKIN. Isolation of an electrophoretically homogeneous crystalline component of β -lactoglobulin.
J.Am.Chem.Soc., 1950,72,4965.
- [57] R.R.PORTER. The unreactive amino groups of proteins.
Biochim.Biophys.Acta, 1948,2,105.
- [58] G.W.SCHWERT and M.A.EISENBERG. The kinetics of the amidase and esterase activities of trypsin.
J.Biol.Chem., 1949,179,665.

- [59] I.W.SIZER. Effects of temperature on enzyme kinetics.
Adv.Enzymol., 1943,3,35.
- [60] J.E.SNOKE and H.NEURATH. The effect of temperature on the esterase activity of chymotrypsin.
J.Biol.Chem., 1950,182,577.
- [61] A.E.STEARN. The theory of absolute reaction rates applied to enzyme catalysis.
Ergebn.Enzymforsch., 1938,7,1.
- [62] O.H.STRAUS and A.GOLDSTEIN. Zone behaviour of enzymes illustrated by the effect of dissociation constant on the system cholinesterase-physostygmine.
J.Gen.Physiol., 1943,26,559.
- [63] T.SVEDBERG and I.B.ERIKSSON. Ultracentrifugal study of the action of papain on ovalbumin.
J.Am.Chem.Soc., 1934,56,409.
- [64] A.TISELIUS and I.B.ERIKSSON-QUENSEL. Some observations on peptic digestion of egg albumin.
Biochem.J., 1939,33,1752.
- [65] F.H.UBER and A.D.McLAREN. Photochemical yield for the inactivation of crystalline trypsin.
J.Biol.Chem., 1941,141,231.
- [66] S.G.WALEY and J.WATSON. The action of trypsin on polylysine.
Biochem.J., 1953,55,328.
- [67] T.WINNICK. General characteristics of the partial hydrolysis products from the action of proteolytic enzymes on casein.
J.Biol.Chem., 1944,152,465.
- [68] R.WURMSER. Conceptions récentes des mécanismes enzymatiques.
Dans: Exposés actuels de biologie cellulaire, Masson, Paris, 1955.
- [69] J.YON. Influence du calcium sur la cinétique de protéolyse de la lactoglobuline par la trypsine.
C.R.Ac.Sc., 1954,238,284.
- [70] J.YON. Action de l'ammonium sur la protéolyse de la lactoglobuline par la trypsine.
C.R.Ac.Sc., 1954,239,448.
- [71] J.YON. Action de quelques cations dans les réactions de protéolyse.
J.Chim.Phys., 1955 (sous presse).
- [72] Cristallisation de la β -lactoglobuline.
Battelle Memorial Institute, Project CHBCH-10.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

**APPLICATION DE L'ÉTUDE DU PARAMAGNÉTISME
EN CHIMIE BIOLOGIQUE**

Vu et approuvé :

Paris, le 24 Avril 1957

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PERES

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean SARRAILH

